

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

A REATIVAÇÃO DE UM TRAÇO DE MEMÓRIA
CONDICIONADA AVERSIVA A PARTIR DA ESTIMULAÇÃO
QUÍMICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSAL

CRISTIANE REZENDE MOCHNY

Florianópolis

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CRISTIANE REZENDE MOCHNY

**A REATIVAÇÃO DE UM TRAÇO DE MEMÓRIA
CONDICIONADA AVERSIVA A PARTIR DA ESTIMULAÇÃO
QUÍMICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Alejandro Molina

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M688r Mochny, Cristiane Rezende

A reativação de um traço de memória condicionada aversiva a partir da estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsal [dissertação] / Cristiane Rezende Mochny ; orientador, Antônio de Pádua Carobrez. - Florianópolis, SC, 2011.

81 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Substância Cinzenta Periaquedutal. 3. Memória - Efeito das drogas. 4. Reconhecimento. I. Carobrez, Antonio de Padua. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Agradecimentos

Algumas pessoas fizeram parte da minha trajetória na execução deste trabalho e merecem um agradecimento especial.

Ao professor Pádua, orientador e amigo, agradeço por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste grupo de pesquisa maravilhoso, onde pude adquirir conhecimentos e acima de tudo fiz grandes amigos. Agradeço a ele pela disponibilidade em me ajudar, sempre que precisei, pela orientação na busca das respostas, e pelos momentos descontraídos que ele proporciona nas horas vagas, fortalecendo a união do grupo.

Ao professor Molina, meu co-orientador, que apesar de longe esteve presente durante toda a realização deste trabalho. Tenho orgulho de ter a oportunidade de receber sua orientação, de poder discutir ciência com o prazer de conversar com um amigo.

Aos professores do departamento de farmacologia, em especial ao professor Leandro, pela oportunidade de participar dos seminários do seu laboratório e pela ajuda com as análises estatísticas. Agradeço também pelas considerações feitas no final desta dissertação, com as quais aprendi bastante e pude melhorar a qualidade desta versão final.

Ao professor Leonardo Resstel, pela disponibilidade em avaliar este trabalho, e pelas valiosas considerações feitas durante a arguição, proporcionando uma discussão rica e que contribuiu para um resultado satisfatório.

À Grasi, quem me ensinou cada passo experimental e me deu dicas valiosas para a realização de um trabalho de qualidade. Ela me passou muito da sua experiência, e com isso conseguimos juntas alcançar resultados dos quais me orgulho bastante. Ela foi a prova de que amizade e trabalho podem se misturar muito bem, e tenho certeza de que esta é uma daquelas amizades especiais que levarei para sempre em minha vida.

Aos demais colegas do laboratório – Eloisa, Ju Kroon, Ju Cavalli, Rimenez, Fabrício e Frank – pelas discussões em grupo, e pela ajuda nos momentos que precisei. Todos estiveram sempre prontos para tirar minhas dúvidas e proporcionaram momentos divertidos que fizeram do meu mestrado um trabalho muito prazeroso.

À minha família, em especial minha mãe e meu irmão, que me apoiaram na decisão de mudar de cidade pra ir em busca da minha realização profissional. Sem seu amor e apoio eu não teria chegado aqui, então eles fazem parte desta conquista. Dedico este trabalho à minha mãe, e ao meu pai, que se orgulharia muito de me ver trabalhando com a ciência.

Ao Ernesto, companheiro e amigo, agradeço pela paciência e dedicação, e por acreditar que eu alcançaria meus objetivos, independente dos obstáculos.

Ao Fabinho, pela gentileza em fornecer os belos desenhos que ilustram este trabalho.

Agradeço o apoio financeiro CAPES e CNPQ e à Universidade Federal de Santa Catarina pelos recursos para a realização da pesquisa científica

Aos demais colegas do departamento – Cris Stern, Lucas, Rafael, Filipe, Evelyn – pelo convívio diário e com quem compartilhei bons momentos.

Aos funcionários do departamento de farmacologia – Diana, Rita, Zu, Pedro e Murilo pela disposição em atender às minhas necessidades.

A todos meus amigos, que ficaram em São Paulo torcendo para que esta etapa fosse concluída com sucesso. Paty, Dani, Sandra, e toda a família Ayalla que sempre acreditou no meu potencial e que me colocou em contato com este universo maravilhoso que é a farmacologia. Meus sinceros agradecimentos a todos.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Palavras-chave: matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral, NMDA, memória aversiva, reativação

O medo excessivo é a principal característica dos transtornos de ansiedade. Portanto, é relevante o estudo dos fatores emocionais que possam modificar as respostas defensivas tornando-as inapropriadas durante a recordação de uma memória aversiva previamente estabelecida. Um crescente número de evidências tem demonstrado que a exposição prévia a diversas situações ameaçadoras facilita a aquisição e a fixação de uma memória de medo associativa durante a aquisição, e tais relatos dão suporte à ideia de que o estado emocional negativo resulta em memórias mais resistentes e duradouras. Pouco foi investigado sobre a influência de uma experiência ameaçadora sobre a recordação de uma memória aversiva previamente consolidada. Para testar a hipótese de que uma experiência emocionalmente negativa poderia modificar a evocação e potencializar a expressão da resposta a uma memória condicionada, o presente trabalho utilizou a estimulação química (microinjeção de NMDA) da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) de ratos com o objetivo de induzir um estado emocional aversivo biologicamente relevante. Tal estimulação foi realizada um dia após o condicionamento e a expressão do medo foi analisada em reexposições subsequentes ao contexto condicionado. Os resultados mostraram que o estado emocional negativo induzido pela estimulação da MCPdl intensificou o traço de memória aversiva quando este traço foi reativado (evocação) um dia, mas não dois, após a estimulação desta área cerebral. No modelo observado, o aumento das respostas defensivas é contingente ao contexto associado já que tal efeito não foi evidente quando os ratos estimulados na MCPdl com NMDA foram colocados em um contexto não-associado. Adicionalmente, não foram observados sinais de generalização uma vez que os ratos expostos à ativação da MCPdl pelo NMDA e reexpostos ao contexto associado não apresentaram aumento das respostas defensivas quando expostos a um novo contexto. Finalmente, o modelo sugere que a potencialização da memória condicionada é duradoura visto que os animais tratados com NMDA exibiram respostas robustas de medo seis dias após a reativação do traço de memória original.

ABSTRACT

Key-words: periaqueductal gray matter, NMDA, fear memory, reactivation.

Excessive fear is a main feature of several anxiety-related disorders. Therefore, it is important to study the emotional factors which may modify fear responses during retrieval of an already established fear memory. A growing number of evidence have revealed that prior exposure to diverse threatening situations facilitates the encoding of fear memory during acquisition and such reports support the widespread notion that emotionally arousal results in stronger and long-lasting memories. Few studies investigated the influence of a threatening experience affect the recovery of a previously consolidated fear memory. To test the hypothesis that an emotionally negative experience could modify the retrieval of a memory and potentiate the responses expressed to a fear memory, the present study used the chemical stimulation (microinjection of NMDA) of the dorsolateral periaqueductal gray matter (dIPAG) of rats in order to induce an aversive emotional state biologically relevant. Such stimulation was performed one day after conditioning and the fear expression was analyzed in subsequent reexposures to the conditioned context. The results showed that the negative emotional state induced by the dIPAG stimulation enhanced the fear memory trace when this trace was reactivated (retrieval) one day after this brain area stimulation. In the model observed, the potentiation of fear responses is contingent to the associated context since no potentiation was evident when NMDA stimulated animals were subsequently placed in a non-associated context. In addition, there were no signs of generalization since animals exposed to the NMDA activation and subjected to the paired context showed no freezing increase when they were exposed to a novel context. Finally, the model suggests that the enhancement of fear responses is long lasting since NMDA-treated animals performed a robust fear response six days after memory reactivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teoria da distância defensiva.....	22
Figura 2. Mecanismos de potenciação a longo prazo (LTP).....	31
Figura 3. Esquema representativo do modelo de processamento de memórias proposto por Lewis em 1979.....	35
Figura 4. Caixa de condicionamento (contexto A).....	43
Figura 5. Caixa de plástico (contexto B).....	43
Figura 6. Caixa de vidro (contexto C).....	44
Figura 7. Protocolo experimental para padronização do condicionamento de medo contextual subliminar.....	46
Figura 8. Protocolo experimental para testar a potencialização das respostas de medo pela estimulação da MCPdl posterior ao condicionamento.....	47
Figura 9. Protocolo experimental para testar a importância da reativação contexto-específica no modelo experimental proposto	48
Figura 10. Protocolo do experimento 4 delineado para investigar se o efeito da estimulação da MCPdl sobre a evocação da memória é duradouro	49
Figura 11. Sítios de injeção	50
Figura 12. Padronização do condicionamento de medo contextual subliminar.....	51
Figura 13. Efeito da estimulação química da MCPdl na evocação do traço de memória.....	53
Figura 14. Importância do contexto associado na reativação da memória original para a potencialização do CD após a estimulação da MCPdl.....	55
Figura 15. Efeito da potencialização do CD pela estimulação da MCPdl com NMDA quando a reativação ocorre 48 após a microinfusão da droga	56-57
Figura 16. Representação esquemática do circuito reverberatório de Hebb.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as características das formas de aprendizado não-associativo.....	27
Tabela 2. Divisão dos grupos no experimento 3	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – aprendizado associativo

ANA – aprendizado não-associativo

ANOVA – análise de variância

BLA – núcleo basolateral da amígdala

CD – comportamento defensivo

CMCS – condicionamento de medo contextual subliminar

dIPAG – *dorsolateral periaqueductal gray matter*

DSM – *Diagnostic Statistic Manual* (Manual de Diagnóstico e Estatística das doenças mentais)

EC – estímulo condicionado

EI – estímulo incondicionado

EN – estímulo neutro

EPM – erro padrão da média

GABA_A – receptor para ácido gama-amino-butírico do tipo A

HPA – hipotálamo-pituitária adrenal

IP – intra-peritoneal

LA – núcleo lateral da amígdala

LNC – Laboratório de Neurobiologia Comportamental

LTP – *long-term potentiation* (potenciação de longa duração)

MCPd – matéria cinzenta periaqueductal dorsal

MCPdl – matéria cinzenta periaqueductal dorsolateral

NMDA – N-metil-D-aspartato

NOS – óxido nítrico sintase

PBS – *phosphate-buffered saline* (salina tampão fosfato)

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

μl – microlitro

μm – micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Medo, ansiedade e comportamento defensivo	21
1.2. Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP)	23
1.3. Aprendizado e memória	25
1.3.1. <i>Aprendizado não-associativo (ANA)</i>	<i>25</i>
1.3.1.1. <i>Bases neurais do aprendizado não-associativo.</i>	<i>28</i>
1.3.2. <i>Aprendizado associativo</i>	<i>29</i>
1.3.2.1. <i>Bases neurais do aprendizado associativo.....</i>	<i>30</i>
1.3.2.2. <i>Aquisição, consolidação e evocação de memórias emocionais.....</i>	<i>32</i>
1.3.2.3. <i>Reativação e reconsolidação de memórias: uma oportunidade para modificar o caráter emocional de uma memória.....</i>	<i>34</i>
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Animais	41
3.2. Cirurgia estereotáxica	41
3.3. Drogas	42
3.4. Aparatos experimentais e medida comportamental..	42
3.5. Procedimentos experimentais	44
3.5.1. <i>Condicionamento de medo contextual subliminar (CMCS).....</i>	<i>44</i>
3.5.2. <i>Estimulação química da MCPdl com infusão de NMDA</i>	<i>45</i>
3.5.3. <i>Sessão de reativação</i>	<i>45</i>
3.5.4. <i>Sessões de teste</i>	<i>46</i>

3.5.5.	<i>Protocolos experimentais</i>	46
3.5.6.	<i>Perfusão e histologia</i>	49
3.5.7.	<i>Análise estatística</i>	50
4.	RESULTADOS.....	51
4.1.	Experimento 1. Padronização do condicionamento de medo contextual subliminar.....	51
4.2.	Experimento 2. A estimulação química da MCPdl posterior ao condicionamento potencializa as respostas de medo contextual condicionadas.....	52
4.3.	Experimento 3. A associação entre eventos aversivos distintos, não relacionados e dissociados no tempo, ocorre somente quando a reativação da memória acontece no mesmo contexto do condicionamento	54
4.4.	Experimento 4. A potencialização das respostas defensivas desaparece quando a reativação ocorre 48 horas a pós a estimulação química da MCPdl	56
5.	DISCUSSÃO	59
6.	SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	69
7.	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Medo, ansiedade e comportamento defensivo

O medo e a ansiedade são emoções compartilhadas por diversas espécies animais e possuem valor adaptativo, na medida em que levam o indivíduo a evitar dano físico ao organismo ou prejuízos psicológicos (Graeff, 1999). Enquanto o medo representa responsividade emocional ao perigo definido e iminente, a ansiedade envolve apreensão em relação a eventos potencialmente ameaçadores, de natureza incerta ou desconhecida (Blanchard e Blanchard, 2008). Evolutivamente, o medo e a ansiedade têm função na sinalização de perigo, e em consequência induzem respostas defensivas apropriadas, dependendo da situação na qual o indivíduo se encontra. Esta função protetora pode ser prejudicada por alguma falha no sistema de detecção da ameaça, pela sucessiva exposição a situações de estresse ou ainda por alguma disfunção de estruturas cerebrais envolvidas no processamento e execução das respostas defensivas, levando à expressão de respostas exacerbadas prejudiciais ao desempenho (Gray, 2000). Neste contexto, em humanos, a ansiedade é considerada patológica quando a eficiência do desempenho de tarefas intelectuais é prejudicada (Graeff, 1999) e ganhou destaque na psiquiatria clínica a partir dos anos 70, quando a classificação dos transtornos de ansiedade começou a ser modelada. A doença que antes era referida como um conceito único de ansiedade, que variava em intensidade de normal a patológica, recebeu classificação conforme as condições clínicas de cada paciente, no início da década de 80, em publicação da Associação Americana de Psiquiatria (1980), no Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais -DSM-III. Conforme a última revisão desta publicação (DSM-IV1994), os transtornos de ansiedade são classificados em transtorno de ansiedade generalizada, transtorno obsessivo-compulsivo, ansiedade social (ou fobia social) generalizada e circunscrita, síndrome do pânico, agorafobia, transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e fobias específicas (Associação Americana de Psiquiatria, 1994).

A psicofarmacologia experimental faz uso dos modelos animais como ferramenta para o estudo da neurobiologia da ansiedade. São utilizados estudos etológicos justificados pela perspectiva evolutiva de Charles Darwin (1872) de que as manifestações emocionais originaram-se em movimentos sujeitos às mesmas leis de hereditariedade que governam a transmissão das características físicas ao longo das gerações.

No âmbito do comportamento defensivo (CD), Robert e Caroline Blanchard contribuíram de maneira importante com seus estudos sistemáticos de observação de estratégias de defesa adotadas por ratos quando confrontados com seu predador natural (gato) em diferentes situações (Blanchard, Flannelly *et al.*, 1986). Os métodos experimentais desenvolvidos pelo casal Blanchard basearam-se em respostas de defesa inatas que serviram como índices de medo ou ansiedade em modelos de medo aprendido, além de demonstrarem sensibilidade a agentes ansiolíticos conferindo a tais modelos validação farmacológica (Gray, 2000). Os estudos dos Blanchard contribuíram também para categorizar as respostas de defesa conforme o tipo da ameaça (presente ou potencial) e a situação (teoria da distância defensiva) conforme ilustrado na figura 1 (para revisão ver Mcnaughton e Corr, 2004).

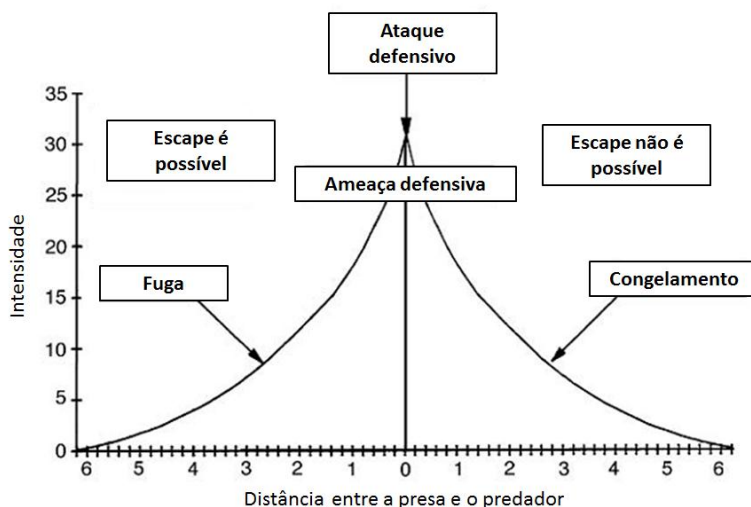


Figura 1. Teoria da distância defensiva. Conforme diminui a distância entre a presa e seu predador, a intensidade do medo aumenta no sentido de controlar a progressão do comportamento de fuga para o congelamento, dependendo da possibilidade ou não de escape, até o ataque defensivo. Adaptado de Mcnaughton & Corr, 2004.

Desta maneira, posturas corporais foram relacionadas com o estado emocional e a situação ameaçadora. Dentre elas, a postura de congelamento tem sido muito utilizada em estudos baseados no

comportamento defensivo de roedores. Considerado um índice confiável de avaliação de medo, o congelamento é um comportamento caracterizado pela imobilidade total do animal, onde se observa ausência de movimentos do corpo, da cabeça e das vibrissas, exceto daqueles movimentos necessários para a respiração (Blanchard e Blanchard, 1969). O comportamento de congelamento é observado na natureza quando a ameaça é próxima e a possibilidade de escape é nula (Blanchard e Blanchard, 1990). Segundo Godsil, Blackmore e Fanselow (2005), o congelamento não se refere a uma simples inibição de movimentos, uma vez que esta postura é acompanhada de alterações fisiológicas como aumento da atividade simpática. No paradigma de condicionamento contextual, alguns autores caracterizam o congelamento como um comportamento típico de ansiedade em relação ao contexto onde um evento aversivo foi vivenciado (Grillon, 2002; Luyten, Vansteenwegen *et al.*, 2010).

Em adição ao entendimento de modelos etológicos para o estudo do CD, a psicofarmacologia experimental utiliza também modelos animais baseados no aprendizado associativo (condicionamento aversivo) para elucidar as estruturas cerebrais envolvidas nos CDs na tentativa de buscar a compreensão da neurobiologia da ansiedade. De maneira geral, sabe-se que a amígdala é um importante sítio de plasticidade associativa com caráter emocional, conectada a outras estruturas do sistema límbico (conjunto de estruturas envolvidas na emocionalidade) e do córtex (Ledoux, 2000). O hipocampo está envolvido com aspectos relacionados ao armazenamento de memórias (Kandel, 1985), enquanto o hipotálamo, além de controlar aspectos motivacionais que influenciam o comportamento, é essencial para a organização da defesa à ameaça predatória (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). A organização e execução dos comportamentos de defesa é controlada pela matéria cinzenta periaquedutal, estrutura mesencefálica ao redor de aqueduto de Sylvius que será objeto de destaque no presente trabalho (para revisão ver Carobrez, Teixeira *et al.*, 2001).

1.2. Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP)

A matéria cinzenta periaquedutal (MCP) é uma área integrativa do neuroeixo conhecida por eliciar diversas respostas defensivas evidentes. Em 1969, Nashold relatou sensações de medo intensas descritas por humanos que foram estimulados eletricamente nesta região do mesencéfalo. Tal sensação de medo foi acompanhada de alterações

autônômicas como piloereção, sudorese, aumento da frequência cardíaca e ruborização da face e pescoço (Nashold, Wilson *et al.*, 1969; Young, 1989). Dados da literatura mostram que a estimulação química ou elétrica da porção dorsolateral desta estrutura (MCPdl) evoca respostas comportamentais aversivas e fisiológicas (imobilidade, corrida, saltos, exoftalmia, micção e defecação, aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca) semelhantes às respostas observadas quando os animais são expostos a uma situação de perigo (Brandao, De Aguiar *et al.*, 1982; Carobrez, Schenberg *et al.*, 1983; Brandao, Coimbra *et al.*, 1990; Coimbra e Brandao, 1997; Brandao, Anseloni *et al.*, 1999; Bittencourt, Carobrez *et al.*, 2004). Desta maneira, a MCP é uma estrutura cerebral que parece estar envolvida na neurobiologia dos ataques de pânico e nas respostas emocionais de outros transtornos de ansiedade (Schenberg e Graeff, 1978; Graeff, 1981; 1990; Teixeira e Carobrez, 1999), integrando as informações relacionadas ao estresse psicológico, sinalizada por outras estruturas límbicas superiores (Floyd, Price *et al.*, 2000).

Além de sua função bem estabelecida na expressão de comportamentos de medo, estudos têm sugerido que a porção dorsal da MCP (MCPd) não é uma estrutura envolvida apenas com a execução de respostas, mas que também participa da modulação de estados aversivos, da execução de respostas sutis de defesa (avaliação de risco, sobressalto e esquiva) observadas em diferentes modelos de emocionalidade (Canteras e Goto, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Fendt, 2000; Sukikara, Mota-Ortiz *et al.*, 2006) e no processo do aprendizado aversivo (Di Scala, Mana *et al.*, 1987; Di Scala, 1989). A MCPd recebe projeções neuronais de sistemas sensoriais (Beitz, 1982) e sua atividade influencia áreas cerebrais envolvidas na aquisição do condicionamento de medo (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011; Johansen, Tarpley *et al.*, 2010).

Pesquisadores demonstraram que a inativação temporária da MCP com muscimol (agonista do receptor GABA_A) prejudicou a aquisição do medo em um paradigma de condicionamento auditivo (Johansen, Tarpley *et al.*, 2010). Este resultado foi complementado por dados de eletrofisiologia que sugeriram que a atividade da MCP estaria envolvida na transmissão da informação aversiva para a amígdala, desta forma instruindo a plasticidade neural necessária para o condicionamento (Johansen, Tarpley *et al.*, 2010). Pavesi e colaboradores (2011) demonstraram a importância da atividade da MCPdl na aquisição de um

condicionamento olfatório em ratos, que utilizou como EI a estimulação química de adrenoreceptores- β do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo de ratos. Adicionalmente, resultados recentes do nosso laboratório mostraram que a estimulação química de receptores glutamatérgicos da MCPdl pode servir com EI interoceptivo no paradigma de condicionamento olfatório em ratos, substituindo o choque elétrico nas patas, corroborando os dados que sugerem a participação desta estrutura na modulação das associações com componente aversivo (Kinchski e Carobrez, 2010).

1.3. Aprendizado e memória

Os modelos animais utilizados para estudo do CD podem ser divididos em dois grandes grupos: aqueles que se baseiam na observação de respostas comportamentais frente a situações aversivas incondicionadas (por exemplo, exposição do sujeito ao seu predador ou ao odor deste) (Blanchard, Flannelly *et al.*, 1986; Dielenberg e McGregor, 2001; Canteras, Kroon *et al.*, 2008) e modelos baseados na avaliação de respostas comportamentais frente a situações aversivas condicionadas, como resultados de paradigmas que envolvam aprendizado (Ledoux, 2000).

O comportamento é influenciado pelo ambiente, e os mais importantes mecanismos pelos quais o ambiente modifica o comportamento são o aprendizado e a memória. Aprender é o processo pelo qual adquirimos conhecimento sobre o mundo, enquanto a memória é o processo pelo qual esse conhecimento é codificado e armazenado para mais tarde, ser evocado (Kandel, 1985). O aprendizado pode ser não-associativo, que ocorre no sentido de conferir um sentido a determinado estímulo, ou associativo, processo que permite estabelecer uma relação entre estímulos distintos ou entre um estímulo e um comportamento (Kandel, 1985).

O estudo dos conceitos de aprendizado associativo e não-associativo, dos processos de armazenamento de memórias e das estruturas cerebrais envolvidas nestes fenômenos são relevantes para o entendimento da neurobiologia da ansiedade.

1.3.1. Aprendizado não-associativo (ANA)

O termo “aprendizado não-associativo” (ANA) refere-se às formas de aprendizado em situações nas quais um animal modifica um

comportamento já estabelecido (definido) frente a um determinado estímulo na ausência de qualquer associação (como pistas do ambiente) ou de um evento (como punição ou reforço). Em outras palavras, a mudança comportamental a um determinado estímulo decorrente deste tipo de aprendizado não requer nenhuma associação específica com ações ou consequências. Em contraste, o aprendizado associativo (AA) conecta estímulos não relacionados: um estímulo pode ser associado a pistas presentes no ambiente, a uma recompensa ou punição ou ainda a uma resposta comportamental (Eichenbaum, 2008).

A habituação e a sensibilização são formas de ANA e são consideradas as formas mais simples de aprendizado observadas em diferentes espécies de animais (Parrott-Sheffer e Tikkanen, 2007). Os trabalhos pioneiros de Eric Kandel investigaram as propriedades comportamentais, fisiológicas e anatômicas destes fenômenos em um invertebrado simples, a *Aplysia* (Eichenbaum, 2008). Na habituação é observada uma diminuição na resposta comportamental frente à apresentação repetida de um determinado estímulo (Groves e Thompson, 1970), mesmo que este estímulo seja percebido por receptores sensoriais (Eichenbaum, 2008). Em roedores e primatas, o modelo de reconhecimento de objetos é um importante teste de memória baseado na habituação a um estímulo (um novo objeto). Os animais geralmente apresentam curiosidade em relação a um novo objeto e tendem a investigá-lo por um tempo. Com a habituação a este objeto, em uma segunda apresentação, o tempo de investigação é reduzido em relação à primeira apresentação (Eichenbaum, 2008). Outros modelos utilizam respostas de habituação para a investigação dos processos de memória em espécies mais simples: no caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Pedreira, Dimant *et al.*, 1995), observa-se a diminuição da resposta de escape a luz que inicialmente é aversiva; no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Rose e Rankin, 2006) observa-se a diminuição da natação em resposta a um estímulo mecânico aplicado na placa de petri.

O fenômeno oposto à habituação é a sensibilização, onde uma experiência emocional pode aumentar a magnitude das respostas comportamentais a uma variedade de estímulos por um período de tempo substancial (Eichenbaum, 2008). O estímulo sensibilizante geralmente é emocionalmente forte e nocivo (Dudai, 2002). Embora tanto a habituação quanto a sensibilização sejam formas de ANA, que resultam na modificação da magnitude das respostas frente a um

estímulo, eles apresentam propriedades divergentes conforme indicado na tabela 1. As consequências da habituação e da sensibilização podem ter origens e mecanismos de controle diferentes: enquanto a habituação opera por uma via específica que analisa o estímulo sensorial e ativa o circuito motor que origina a resposta, a sensibilização altera o estado do organismo como um todo e a responsividade dele a uma ampla variedade de estímulos, influenciando vários circuitos reflexos (Eichenbaum, 2008).

Tabela 1. Comparação entre as características das formas de aprendizado não-associativo. Adaptado de Eichenbaum, 2008.

Habituação	Sensibilização
Especificidade para estímulo e resposta	Generalizada para uma variedade de estímulos e respostas
Resulta em diminuição da magnitude da resposta	Resulta no aumento da magnitude da resposta
Específica a circuitos cerebrais particulares	Aumenta responsividade em vários circuitos
Ocorre após a repetição de uma variedade de tipos de estímulos	Ocorre apenas após um estímulo emocional
Exibida na forma de curta ou longa-duração.	Normalmente persiste apenas por um curto período de tempo.

Dados da literatura sugerem que o histórico de maus tratos físicos ou emocionais durante a infância, bem como de abuso sexual infantil estão relacionados com maior severidade dos sintomas em pacientes com ansiedade social (Simon, Herlandset *et al.*, 2009), com o aumento da resposta de sobressalto acústico, com sintomas de TEPT (Jovanovic, Blanding *et al.*, 2009) e com outros transtornos de ansiedade (Sanchez, Ladd *et al.*, 2001; Van Harmelen, Van Tol *et al.*, 2010), evidenciando sensibilização do medo decorrente no estresse no início da vida. Experiências emocionalmente importantes modificam o desenvolvimento cerebral (Van Harmelen, Van Tol *et al.*, 2010) e desta forma, o histórico emocional negativo do indivíduo parece interferir no processamento de uma experiência aversiva, podendo aumentar a relevância de um evento traumático e modificar o padrão de processamento da memória e a consequente execução de respostas defensivas inapropriadas.

O estado emocional pode influenciar na potencialização da resposta de sobressalto em ratos (Richardson, 2000). O sobressalto sensibilizado pelo choque, termo introduzido por Davis (1989), basicamente refere-se a um aumento da resposta de sobressalto (acústico) em ratos submetidos a uma série de choques elétricos, aplicados nas patas em uma sessão realizada entre a sessão de avaliação do sobressalto basal ao som e a sessão de teste, comparados à resposta de ratos que não receberam choques. Adicionalmente, o modelo de exposição crônica ao estresse demonstrou ser eficiente em potencializar as respostas de medo em ratos submetidos ao paradigma de condicionamento contextual, promovendo sensibilização persistente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) observada em respostas a novos estressores agudos (Mcguire, Herman *et al.*, 2010). Bignante e colaboradores investigaram as bases moleculares da sensibilização do medo induzida pelo estresse e demonstraram um aumento da proteína p35, um marcador biológico cuja atividade foi associada à formação de memórias de medo, no núcleo basolateral da amígdala (BLA), em um modelo de estresse de contenção em ratos (Bignante, Paglini *et al.*, 2010).

1.3.1.1. *Bases neurais do aprendizado não-associativo*

O modelo do reflexo de retirada defensiva das brânquias no molusco marinho *Aplysia* foi utilizado para a elucidação dos mecanismos neurais dos fenômenos de habituação e sensibilização (Carew, Pinsker *et al.*, 1972). As brânquias são uma porção delicada deste organismo, utilizadas para respiração, e quando este molusco está em repouso, as brânquias permanecem estendidas na região abdominal. Por serem estruturas facilmente danificadas, em situações de perigo a *Aplysia* adota o reflexo de retirada para proteger esta região necessária à sua sobrevivência. A *Aplysia* apresenta o circuito reflexo mais simples e que consiste de três estágios principais: o receptor sensorial que detecta o estímulo, um interneurônio que transmite o sinal sensorial aos neurônios motores, e os neurônios motores que coordenam as contrações musculares. Com base neste modelo, pesquisadores demonstraram que a habituação acontece a partir de modificações na operação dos interneurônios, e não no receptor sensorial (que consistiria em adaptação sensorial) ou no neurônio motor (neste caso consistiria em fadiga muscular) (Eichenbaum, 2008).

As bases neurais da sensibilização também foram investigadas utilizando-se o modelo do reflexo de retirada defensivo das brânquias na

Aplysia (Carew, Pinsker *et al.*, 1972). O protocolo consiste em estimular a cauda do animal com um choque elétrico, que aumenta a robustez da resposta de retirada reflexa das brânquias. Um único choque forte na cauda promove sensibilização que dura minutos, enquanto que séries de quatro ou cinco choques sensibiliza as respostas por alguns dias. O circuito neural mediador da sensibilização é o mesmo envolvido na habituação, com a adição de neurônios sensoriais que inervam a cauda e interneurônios adicionais. Os pesquisadores observaram que um choque na cauda da *Aplysia* aumenta a responsividade de várias vias reflexas, pois ativa os neurônios sensoriais da cauda que se conectam com interneurônios modulatórios via sinapses serotoninérgicas. A liberação de serotonina pelos interneurônios modulatórios resulta no bloqueio dos canais de K^+ dos neurônios sensoriais e na consequente prolongação da duração do potencial de ação, que aumenta a responsividade dos neurônios motores e magnifica a resposta comportamental a qualquer novo estímulo. A sensibilização é o aumento da resposta reflexa observado no nível comportamental (Eichenbaum, 2008).

1.3.2. *Aprendizado associativo*

Em animais de laboratório, os paradigmas de condicionamento são ferramentas importantes para a investigação dos processos envolvidos no aprendizado associativo. Pavlov, no início do século XX, realizou os primeiros experimentos de condicionamento clássico e introduziu os conceitos para o estudo sistemático do aprendizado associativo. Desde então, sabe-se que um estímulo inicialmente neutro (EN) pode adquirir relevância emocional se for associado a um estímulo incondicionado (EI) com propriedades biologicamente significantes. Depois de aprendida esta associação, o EN passa a ser chamado de estímulo condicionado (EC) e a simples apresentação deste evoca respostas antes observadas somente na apresentação do EI (Ledoux, 2000). Em paradigmas de condicionamento de medo, o EN pode ser de natureza visual, auditiva ou olfatória, que adquire propriedades aversivas ao ser associado com o EI, de natureza exteroceptiva (por exemplo, um estímulo doloroso) (Kim e Fanselow, 1992; Ledoux, 2000) ou interoceptiva (sensação interna, por exemplo, injeção de compostos ansiogênicos ou estimulação de áreas cerebrais envolvidas na expressão do medo) (Di Scala, Manaet *al.*, 1987; Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011).

1.3.2.1. *Bases neurais do aprendizado associativo*

Evidências experimentais acumuladas nas últimas décadas indicam que o mecanismo celular de potenciação de longa duração (LTP, *long-term potentiation*) pode ser a base do aprendizado associativo e da formação de memórias (Fanselow e Poulos, 2005; Sah, Westbrook *et al.*, 2008). O fenômeno da LTP ocorre quando um sinal pré-sináptico promove um potencial de ação pós-sináptico e facilita a estimulação do neurônio pós-sináptico, e tem como propósito fortalecer as conexões sinápticas entre neurônios (Eichenbaum, 2008). Quando a estimulação pré-sináptica é suficiente para produzir um potencial de ação na célula-alvo (pós-sináptica), a estimulação simultânea de outra sinapse, mesmo que abaixo do limiar, promoverá a ativação pré-sináptica simultaneamente. A figura 2 representa esquematicamente os mecanismos moleculares de formação da LTP. Como resultado, ambas as sinapses têm LTP e estão “associadas”, de maneira que a estimulação de um neurônio irá ativar os outros neurônios como se todos estivessem sendo estimulados ao mesmo tempo. O fenômeno, chamado de LTP associativa, sustenta associações entre estímulos ou entre um estímulo e uma resposta (Eichenbaum, 2008) e provavelmente constitui a base molecular do armazenamento das informações associativas. Portanto, a formação da memória parece ser dependente da indução da LTP. É de grande interesse a elucidação da neurobiologia do condicionamento de medo, através do mapeamento dos circuitos neurais envolvidos e da identificação de plasticidade sináptica nestes circuitos (Maren, 2001).

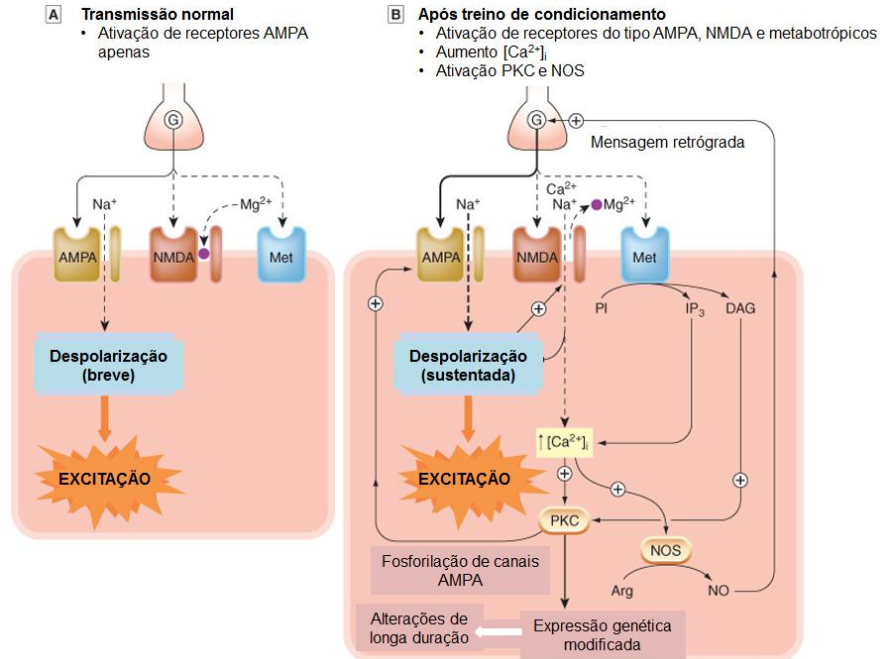


Figura 2. Mecanismos de potenciação a longo prazo (LTP). (A) Com atividade sináptica infrequente, o glutamato ativa principalmente os receptores do tipo AMPA. Existe uma quantidade insuficiente de glutamato para ativar os receptores metabotrópicos (Met) e os canais do receptor tipo NMDA estão bloqueados por Mg^{2+} . (B) Após treino de condicionamento, a liberação repetida de glutamato é suficiente para ativar os receptores metabotrópicos, e os canais NMDA são desbloqueados pela despolarização sustentada. A PKC fosforila diversas proteínas incluindo os receptores AMPA (produzindo facilitação da ação do transmissor) e outras moléculas de transdução de sinais que controlam a transcrição de genes (não representada) nas células pós-sinápticas. A liberação de NO facilita de maneira retrógrada a liberação de glutamato. (G, glutamato; NMDA, N-metil-D-aspartato; AMPA, α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol; PI fosfatidilinositol; IP_3 , trifosfato de inositol; DAG, diacilglicerol; PKC proteína quinase; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintase). (Adaptado de (Rang, 2007).

Um grande avanço nas pesquisas em psicofarmacologia experimental foi observado a partir de estudos de lesão na amígdala que bloquearam a aquisição e a expressão de respostas de medo condicionadas ao contexto (Blanchard e Blanchard, 1972; Helmstetter, 1992). Dados consistentes da literatura estabeleceram que os núcleos do complexo amigdalóide recebem informações sensoriais de áreas corticais e subcorticais e atribuem significância emocional a tais informações (Aggleton, 1993), controlando a expressão da resposta emocional através de projeções neuronais para áreas do mesencéfalo e do tronco cerebral (Petrovich e Swanson, 1997; Ledoux, 2000). Rogan e Ledoux (1995) mostraram que a indução de LTP nas vias de transmissão da informação do EC auditivo para o núcleo lateral da amígdala (LA) promoveu um aumento no potencial de ação evocado neste núcleo. Mais tarde, os mesmos pesquisadores mostraram que o condicionamento de medo auditivo modifica as respostas evocadas pelo EC auditivo da mesma maneira que indução de LTP feita anteriormente, sugerindo que o processo associativo via LTP que ocorre durante o condicionamento pode ser a base da plasticidade associativa de longa duração que constitui a memória do condicionamento de medo (Rogan, Staubli *et al.*, 1997). Considerável número de publicações reforçam estas ideias e sugerem que o núcleo LA é um importante sítio de plasticidade associativa e formação de memórias emocionais (Fanselow e Ledoux, 1999), com papel central no aprendizado aversivo e na expressão do medo, através de suas projeções neuronais para regiões do mesencéfalo (para revisão ver LeDoux, 2000).

O estudo sistemático do aprendizado associativo aversivo, através dos modelos animais de condicionamento de medo, permite avaliar aspectos neurobiológicos das diferentes etapas da plasticidade associativa e formação da memória que serão abordadas adiante: aquisição, consolidação, evocação e reconsolidação das memórias de medo.

1.3.2.2. Aquisição, consolidação e evocação de memórias emocionais

Na etapa inicial do aprendizado, um traço de memória é adquirido e suas propriedades são modificadas de maneira tempo-dependente. Após esta fase, este traço de memória é consolidado em regiões cerebrais específicas, através de síntese proteica sendo retido como memória de longa duração (Nader, 2003). Em modelos de condicionamento, as

respostas evocadas pelo EC são avaliadas durante a fase de aquisição (que constitui a sessão de treino do condicionamento) e durante o teste de evocação, quando a expressão do comportamento frente ao EC isolado confirma o aprendizado da associação EC-EI (Rodrigues, Ledoux *et al.*, 2009).

Para o estudo da aquisição do aprendizado aversivo, manipulações farmacológicas são realizadas antes do início do treino de condicionamento. Antagonistas seletivos do receptor glutamatérgico do tipo NMDA (conhecidos por prevenir a indução de formas comuns de LTP no hipocampo) e inibidores da síntese de RNAm promoveram prejuízo do aprendizado do condicionamento contextual quando injetados na amígdala de roedores (Miserendino, Sananes *et al.*, 1990; Fanselow e Kim, 1994; Bailey, Kim *et al.*, 1999). No protocolo de condicionamento olfatório de medo em ratos desenvolvido por Kroon e Carobrez (2009), a aquisição da associação EC-EI foi prejudicada pela administração sistêmica pré-treino de midazolam, propranolol e escopolamina, mostrando a eficácia destas drogas em prejudicar o aprendizado associativo aversivo.

A etapa de consolidação começou a ser elucidada a partir de estudos de amnesia retrograda realizados em 1941 por Zubin e Barrera. Logo, pesquisadores observaram que a memória adquirida após uma experiência estava sujeita a interferências por um período após o aprendizado, e que este período seria finito (Eichenbaum, 2008). Mais tarde, foi elucidado que um processo ativo e dependente de síntese proteica é responsável pela fixação da memória e este período de labilidade tem duração que pode variar conforme a espécie e a tarefa aprendida. Foi postulado que a consolidação ocorre entre 2 e 6 horas após a aquisição (Pedreira, Dimant *et al.*, 1995) e durante este período, a memória é sensível a agentes farmacológicos e procedimentos comportamentais que podem prejudicar ou intensificar o aprendizado. Já foi demonstrado que drogas com propriedades amnésicas como os benzodiazepínicos, antagonistas dos receptores muscarínicos, inibidores de síntese proteica, inibidores da NOS e do fator de transcrição NF- κ B, são eficazes em prejudicar a consolidação nos paradigmas de condicionamento (Baratti, Boccia *et al.*, 2009). Um novo aprendizado realizado durante a fase de consolidação também prejudica o aprendizado, conforme demonstrado por Baratti e colaboradores (Boccia, Blake *et al.*, 2005). Estas manipulações afetam, de alguma maneira, os mecanismos moleculares da formação da LTP, necessária

para a estabilização da memória. Desta forma, as intervenções no processo de consolidação são realizadas imediatamente após a sessão de treino, dentro do período estabelecido para que aconteçam os eventos moleculares descritos para a estabilização da memória (para revisão ver (Mcgaugh, 2000).

Com a finalidade de verificar a retenção da memória do aprendizado, o teste de evocação é realizado geralmente 24 h após o treino, podendo ser realizado após períodos maiores, com a finalidade de avaliar se a memória é persistente. A evocação consiste na recordação do aprendizado. Neste teste, a apresentação do EC isolado promove a recuperação da associação EC-EI e a expressão do comportamento (Rodrigues, Ledoux *et al.*, 2009). Nos paradigmas de condicionamento de medo contextual, o teste de retenção é realizado através da reexposição ao contexto do condicionamento, onde durante a fase de aquisição foram aplicados choques elétricos nas patas.

1.3.2.3. Reativação e reconsolidação de memórias: uma oportunidade para modificar o caráter emocional de uma memória

Durante muitos anos, acreditou-se que uma vez consolidada, a memória não poderia mais ser modificada através de intervenções farmacológicas ou comportamentais. Entretanto, estudos mais recentes, demonstraram que a evocação através de uma pista (EC) retorna a memória original para um estado lábil, sendo necessária nova síntese proteica para que essa memória possa persistir (Nader e Hardt, 2009). Esse fenômeno, denominado “reconsolidação”, foi demonstrado em diversas espécies de invertebrados e vertebrados, incluindo humanos (Forcato, Burgos *et al.*, 2007), através de intervenções farmacológicas e comportamentais durante este período de labilidade, que demonstraram eficácia em modificar a expressão comportamental em testes de evocação subsequentes (para revisão ver Nader e Hardt, 2009).

O termo “reativação” foi introduzido em 1968 por Misanin e colaboradores, pioneiros na demonstração de amnesia resultante de uma intervenção (choque eletroconvulsivo) realizada após a evocação de um traço de memória consolidado (Misanin *et al.*, 1968 apud Nader, 2003). Segundo o modelo proposto por Lewis em 1979 (figura 3), a memória em estado inativo retorna para o estado ativo ao ser reativada, sendo que esta reativação pode ser promovida pela evocação da memória (Nader,

2003). Um estímulo que ativa as sinapses associativas formadas durante o aprendizado, pode ativar todo o conjunto de neurônios que armazenam a informação, promovendo a reativação da memória (Hebb, 1949 apud Eichenbaum, 2008). Ao retornar para o estado ativo, é necessária nova síntese proteica para que a memória possa ser novamente estabilizada, como acontece na fase de consolidação (para revisão ver Alberini, 2005). Durante este período de instabilidade (estado ativo) a memória é lábil e susceptível a ação de agentes farmacológicos com propriedades amnésicas (Sara, 2000; Nader, 2003; Bustos, Maldonado *et al.*, 2006; Dudai, 2006). Muitos autores referem-se a este período como janela de reconsolidação e diversas manipulações demonstraram eficácia em prejudicar uma memória que já havia sido consolidada (Nader, Schafe *et al.*, 2000; Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004; Alberini, 2005). A indução experimental de amnesia retrograda de uma memória consolidada é criticamente dependente da reativação da memória (Nader, 2003).

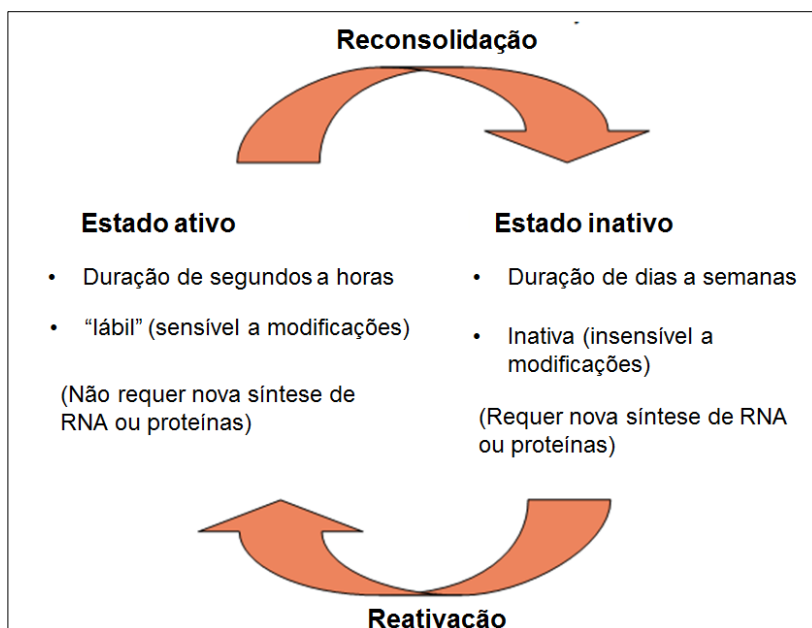


Figura 3. Esquema representativo do modelo de processamento de memórias proposto por Lewis em 1979. A memória consolidada, inicialmente no estado inativo, ao sofrer reativação passa para um estado ativo e requer reconsolidação para voltar para o estado inativo (estável). Adaptado de Nader, 2003.

De maneira geral, os estudos de reconsolidação evidenciam a labilidade induzida pela evocação através de demonstrações de prejuízo na resposta comportamental em testes de retenção posteriores quando agentes amnésicos são administrados imediatamente após a reativação da memória original (Nader, Schafe *et al.*, 2000; Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004; Dudai, 2006; Bustos, Maldonado *et al.*, 2009; Nader e Hardt, 2009). Neste sentido, o processo de reconsolidação teria como propósito re-estabilizar memórias de relevância adaptativa (Lee, 2009) para que possam persistir, ao invés de tornarem-se menos acessíveis com o passar do tempo (Nader e Hardt, 2009).

A reconsolidação é evolutivamente importante para os indivíduos uma vez que consiste em uma oportunidade para modificar a memória original (Bustos, Maldonado *et al.*, 2006; Lee, 2010). Na fase de reconsolidação, é sugerida a possibilidade de fortalecer ou enfraquecer uma memória com um novo aprendizado (Lee, 2008), modificar o caráter emocional de uma memória associativa (Nader, Schafe *et al.*, 2000; Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004; Dudai, 2006; Bustos, Maldonado *et al.*, 2009; Nader e Hardt, 2009) e agregar novas informações à memória original (Hupbach, Gomez *et al.*, 2007). Alguns autores propuseram recentemente que a reconsolidação é a manifestação do mecanismo de atualização da memória, com o propósito de adaptar a memória reativada às novas circunstâncias (Sara, 2000; Dudai, 2006).

Neste sentido, considerando a importância de fatores emocionais e ambientais no momento da reativação de uma memória de medo associativa, delineamos a hipótese de que o estado emocional do indivíduo poderia alterar o significado emocional de um EC, no momento da evocação do traço de memória, modificando a resposta comportamental em evocações subsequentes. No presente estudo, foi proposto que a estimulação química da MCPdl poderia ser utilizada como ferramenta para mimetizar uma experiência aversiva, considerando que esta manipulação promove um estado emocional negativo e biologicamente relevante. Para que fosse possível a observação de um aumento na intensidade das respostas defensivas, um condicionamento subliminar foi empregado para formar um traço de memória, evidenciado pela baixa porcentagem de tempo gasto em postura defensiva. A estimulação da MCPdl foi realizada um dia após o aprendizado associativo, com o objetivo de sensibilizar o estado emocional do animal para o momento da evocação, que aconteceu vinte e quatro horas após a estimulação da MCPdl. Desta forma, foram

observadas as respostas defensivas em exposições ao contexto condicionado em sessões subsequentes.

2. OBJETIVOS

Baseado nos fatos expostos, o objetivo do presente trabalho foi verificar se o estado emocional aversivo promovido pela estimulação química da MCPdl poderia sensibilizar a recordação de um evento traumático, modificando as respostas defensivas frente a um contexto anteriormente pareado com um estímulo aversivo.

Para atingir o objetivo proposto, foram delineados os seguintes objetivos intermediários:

- Padronizar o condicionamento de medo contextual subliminar para permitir a observação de respostas de medo em níveis baixos passíveis de potencialização (formação do traço de memória);
- Avaliar o efeito da estimulação química da porção dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPdl) na potencialização das respostas de medo originadas a partir de um condicionamento de medo contextual;
- Avaliar a importância da reativação da memória para o aumento das respostas defensivas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem *Wistar*, com 3-4 meses de idade pesando entre 320g e 400g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (50 x 30 x 15 cm) em grupos de três ou quatro, com livre acesso a água e alimento e aclimatizados com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) sob ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (período claro das 7 às 19 horas) no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental (LNC) por uma semana antes do início dos experimentos. Os procedimentos experimentais utilizados no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (23080.0055752/2006-64/UFSC) e estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

3.2. Cirurgia estereotáxica

Uma semana antes do início dos experimentos, os ratos foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guias direcionadas para a porção dorsolateral da MCP. As cânulas foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas hipodérmicas (25 x 7mm, BD Precision Glide®, Brasil) e com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Brasil) o tamanho foi ajustado para 13 mm.

Cada rato foi anestesiado com uma injeção intraperitoneal (IP) de uma solução de xilazina (10 mg/ml/kg, Sespo Ind. Com. Ltda, Brasil) e quetamina (100 mg/ml/kg, Sespo Ind. Com. Ltda, Brasil) e depois de confirmada a perda total dos reflexos, o animal foi fixado em um aparelho estereotáxico (Stoelting Co., EUA) e realizou-se a tricotomia na região superior da cabeça. Após assepsia desta área com álcool iodado, uma solução (3%) de lidocaína com adrenalina (1:50.000, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea e devido ao efeito vasoconstritor e anestésico local, a formação de uma pápula ovalada auxiliou a retirada da pele no local. Em seguida, o periósteo foi raspado com o objetivo de expor a calota craniana, permitindo a visualização das suturas lambdoide, sagital e coronária e o posicionamento do Bregma e do Lambda no plano horizontal. Com o auxílio de uma broca odontológica, a calota craniana foi perfurada para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável no osso frontal e de uma

cânula guia de 13 mm direcionada para a MCPdl, cujas coordenadas para implantação (anteroposterior (AP)=-7,6 mm em relação ao Bregma, médio-lateral (ML)=+1,9 mm e dorsoventral=-2 mm a partir da superfície externa do osso craniano em um ângulo de 22°) foram obtidas do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998). Um mandril nº 26 foi inserido na cânula para prevenir a sua obstrução. Uma vez adaptados os parafusos e a cânula, a superfície craniana foi seca e a área aberta foi preenchida com acrílico auto-polimerizável que, decorridos alguns minutos para secagem, fixou todas as peças formando uma prótese sólida. Os animais foram então retirados do estereotático e receberam a administração por via subcutânea de uma solução de flunixin meglumina (Banamine® 2.5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil), um fármaco com propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética, e por via intramuscular uma associação de antibióticos (Pentabiotico®, 1.0ml/kg; Fort Dodge, Brasil) para prevenir infecções e garantir a boa recuperação dos animais após as cirurgias.

Ao término das cirurgias, os ratos foram mantidos em uma sala aquecida até o desaparecimento completo dos efeitos da anestesia geral. Em seguida, os ratos retornaram ao biotério para suas caixas moradia com livre acesso à água e alimento e permaneceram em recuperação por sete dias antes do início da fase experimental.

3.3. Drogas

A estimulação química dos neurônios da porção dorsolateral da MCP foi realizada através da infusão de N-Metil-D-Aspartato (NMDA; Sigma, St. Louis, MO), um aminoácido excitatório sintético análogo do glutamato, agonista do receptor glutamatérgico do tipo NMDA (Rang, 2007). A droga foi dissolvida em uma solução 0,1M de salina tampão fosfato (phosphate-buffered saline, PBS; pH 7,4). O PBS livre de droga foi utilizado como veículo nos grupos controle. A escolha da dose de 100 pmol de NMDA foi baseada em trabalhos anteriores do LNC (Moraes, Bertoglio e Carobrez, 2008) que mostraram a expressão de comportamentos defensivos evidentes quando esta dose foi administrada na MCPdl.

3.4. Aparatos experimentais e medida comportamental

Três caixas de materiais e dimensões diferentes foram utilizadas no presente estudo: uma caixa de condicionamento, uma caixa plástica e

uma caixa de vidro. Durante os experimentos, as caixas foram acomodadas em uma sala com som atenuado e com nível de iluminação na intensidade de 80 lux. As caixas foram higienizadas com toalhas de papel embebidas em uma solução de etanol 10 % (v/v) antes e depois da passagem de cada animal.

A caixa de condicionamento (figura 4) foi designada como contexto A (23 cm x 20 cm x 26 cm) e foi construída em paredes de aço inoxidável (laterais e fundo) e acrílico transparente (parede frontal e tampa), e um piso gradeado, com barras espaçadas 1 cm entre si conectadas a um gerador de choque (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) que, quando necessário, possibilitava a emissão de choques elétricos na intensidade e tempo de disparos programados.



Figura 4. Caixa de condicionamento (contexto A).

Uma caixa de plástico (50 x 30 x 15 cm), coberta com uma grade metálica, designada como contexto B (figura 5), foi utilizada para colocar os animais imediatamente após a microinjeção na MCPdl.



Figura 5. Caixa de plástico (contexto B).

O terceiro contexto (figura 6), uma caixa confeccionada em vidro (28 x 28 x 28cm) completamente diferente dos aparatos A e B, foi designada como contexto C.

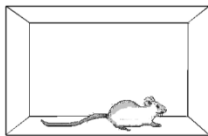


Figura 6. Caixa de vidro (contexto C).

A medida comportamental utilizada no presente trabalho foi o tempo de congelamento (*freezing*). O congelamento é um CD caracterizado pela imobilidade total do animal, onde se observa ausência de movimentos do corpo, da cabeça e das vibrissas, exceto daqueles movimentos necessários para a respiração (Blanchard e Blanchard, 1969). O tempo total gasto no comportamento de congelamento em cada sessão foi quantificado em segundos e expresso como porcentagem do tempo total da sessão.

3.5. Procedimentos experimentais

Todos os experimentos foram realizados durante a fase diurna, entre 13 e 17 horas. Cada sessão foi gravada por uma vídeo-câmera, instalada na sala de experimentos conectada a um monitor e a um sistema de gravação de DVD, os quais estavam em uma sala adjacente. Antes do início dos experimentos, os animais foram colocados em uma sala adjacente à sala de experimentos para ambientação durante 30 minutos.

3.5.1. Condicionamento de medo contextual subliminar (CMCS)

Se a associação entre o estímulo aversivo incondicionado (EI) e o estímulo neutro (EN) não acontecer em magnitude suficiente para que o estímulo condicionado (EC) passe a evocar respostas defensivas, é possível que o condicionamento não tenha sido eficiente em conferir um caráter emocional relevante ao estímulo inicialmente neutro. O resultado deste aprendizado pode ser um traço de memória que poderia ser potencializado por outros eventos traumáticos. Dados anteriores obtidos no LNC mostraram que 5 choques de leve intensidade são necessários para promover um condicionamento olfatório de medo (Kroon e Carobrez, 2009) e 3 choques associados a uma injeção sistêmica de pentilenotetrazol (em dose sub-convulsivante) são suficientes para promover um condicionamento olfatório no mesmo paradigma (Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009). Com o objetivo de padronizar o condicionamento de medo contextual subliminar (CMCS), na primeira

fase experimental, os ratos foram colocados na caixa de condicionamento e exploraram o ambiente por um minuto (pré-choque). Durante o segundo minuto (fase de condicionamento), foram aplicados 0, 1, 3 ou 5 choques de intensidade leve (0,5 mA, durante 3 s, com intervalo de 30 s entre os choques). Os animais permaneceram na caixa de condicionamento por mais um minuto após a aplicação dos choques. O tempo total da sessão de condicionamento foi de 3 min, com exceção do grupo 5 choques que permaneceu 4 min na caixa já que a fase de condicionamento teve duração de 2 min.

3.5.2. *Estimulação química da MCPdl com infusão de NMDA*

Os ratos foram aleatoriamente retirados de suas caixas-moradia e receberam a infusão de NMDA (100 pmol) ou veículo (PBS) na MCPdl. A microinjeção intracerebral da droga ou veículo (volume = 0,2 µl) foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) na razão de 0,6 µl/min. A agulha injetora (diâmetro externo = 0,3 mm) foi confeccionada no tamanho de 16,2 mm, sendo que quando introduzida na cânula-guia (13 mm) estendeu-se 3,2 mm abaixo do final da cânula, atingindo a porção dorsolateral da MCP. Um tubo de polietileno (PE10; Clay Adams, USA) foi utilizado para conectar a parte superior da agulha a uma microseringa (5 µl; Hamilton®) e uma bolha de ar formada dentro deste tubo foi utilizada para monitorar a vazão da droga. Para maximizar a difusão e evitar possível refluxo da droga, a agulha só foi removida da cânula 20 s após o final da infusão da droga.

Imediatamente após a microinjeção, cada rato foi colocado no contexto B durante 10 minutos, sendo devolvido à colônia após este período.

3.5.3. *Sessão de reativação*

Nesta etapa experimental, os ratos foram colocados na caixa de condicionamento (reexposição ao contexto A) durante 3 min, sem aplicação do EI, e o tempo de congelamento foi quantificado. Em um experimento delineado para verificar a dependência do contexto nesta etapa do protocolo experimental, outro grupo foi colocado no contexto C durante 3 min e novamente, o tempo de congelamento foi quantificado.

3.5.4. Sessões de teste

As sessões de teste foram realizadas no contexto A ou no contexto C, dependendo do desenho experimental. Os ratos foram colocados no contexto A por 3 min e o tempo de congelamento foi quantificado. Esta sessão foi realizada 24 h ou 6 dias após a sessão de reativação, dependendo da etapa experimental. Quando necessário, o teste no contexto C (durante 3 min) foi realizado 24 h após o teste no contexto A para avaliar se ocorreu o fenômeno de generalização do comportamento, ou seja, para confirmar se o comportamento expresso é contexto-específico.

3.5.5. Protocolos experimentais

Experimento 1. Padronização do condicionamento de medo contextual subliminar.

Este experimento foi delineado com o objetivo de padronizar o protocolo de CMCS com base na expressão das respostas de congelamento dos animais. Um CMCS adequado deve promover respostas enfraquecidas, passíveis de serem potencializadas por um evento aversivo posterior (Cavalli, Bertoglio e Carobrez, 2009). Os animais utilizados nesta etapa experimental não foram submetidos à cirurgia estereotáxica.

No dia 1, os ratos foram submetidos ao procedimento de CMCS, sendo divididos em grupos que receberam 0, 1, 3 ou 5 choques nas patas, precedidos de 1 min de exploração livre na caixa e com mais 1 min pós-choque. A expressão comportamental de congelamento foi avaliada no contexto A, 24 h após a sessão de treino (dia 2, sessão de reativação) e no dia seguinte (dia 3, sessão de teste) conforme figura 7.

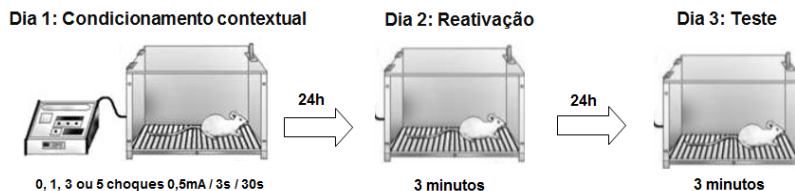


Figura 7. Protocolo experimental para padronização do condicionamento de medo contextual subliminar.

Experimento 2. Efeito da estimulação química da MCPdl sobre as respostas de medo contextual condicionadas.

Este experimento foi delineado com o objetivo de verificar se a estimulação química da MCPdl, poderia interferir com um traço de memória de medo consolidado e alterar a expressão do comportamento defensivo. No dia 1, os animais foram submetidos ao CMCS e receberam 0, 1, ou 3 choques. No dia 2, os ratos receberam a microinjeção intracerebral de NMDA ou veículo (PBS) na MCPdl e no dia 3 todos os grupos foram re-expostos ao contexto do condicionamento (contexto A) durante 3 min para a sessão de reativação. Seis dias depois (dia 9), foi realizado o teste no contexto A durante 3 min e o tempo total de congelamento foi quantificado. Na sessão seguinte (dia 10), os ratos foram expostos durante 3 min ao contexto C a fim de avaliar o processo de generalização do comportamento (figura 8).

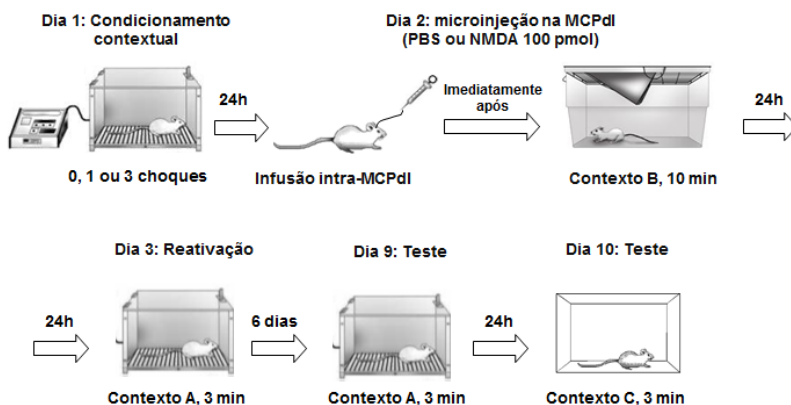


Figura 8. Protocolo experimental para testar a potencialização das respostas de medo pela estimulação da MCPdl posterior ao condicionamento.

Experimentos 3 e 4. Investigação da importância da etapa de reativação da memória de medo condicionado.

O objetivo do experimento 3 foi verificar se a reativação do traço de memória consolidado no contexto específico (contexto A) é fator determinante para a expressão da potencialização do comportamento defensivo, observada após a estimulação química da MCPdl. Para este propósito, os ratos foram condicionados com 3 choques nas patas no contexto A (CMCS) no dia 1 e receberam a microinjeção de NMDA ou

PBS na MCPdl no dia 2. No dia 3, os animais foram divididos em dois grupos experimentais, conforme o contexto selecionado para esta etapa: a) reativados - ratos que foram reexpostos ao contexto A por 3 min ou b) não-reativados - ratos que foram expostos ao contexto C por 3 min, conforme figura 9. No dia 4, todos os animais foram expostos à sessão de teste no contexto A. O tempo de congelamento foi quantificado em ambos os grupos durante a exposição ao contexto selecionado. A tabela 2 mostra os grupos experimentais desta etapa.

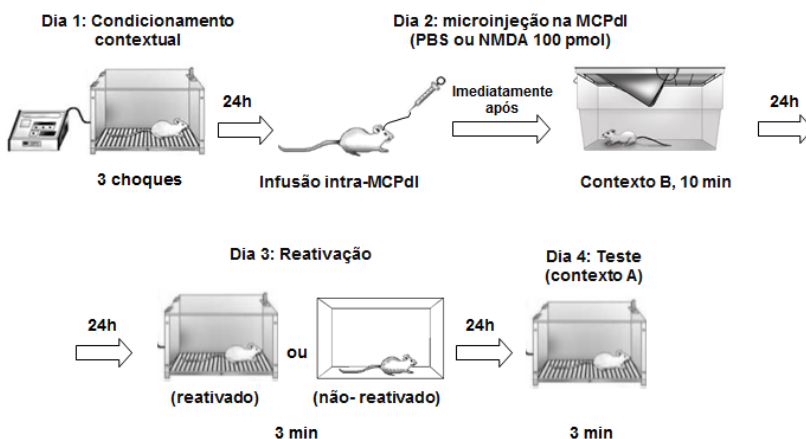


Figura 9. Protocolo experimental para testar a importância da reativação contexto-específica no modelo experimental proposto.

Tabela 2. Divisão dos grupos no experimento 3.

Dia 1 (pareamento)	Dia 2 (infusão MCPdl)	Dia 3 (reativação)	Dia 4 (teste)	Nome do grupo
3 choques	PBS	Reexposição contexto A	contexto A	Reativados (n=10)
3 choques	NMDA	Reexposição contexto A	contexto A	Reativados (n=9)
3 choques	PBS	Exposição contexto C	contexto A	Não- reativados (n=6)
3 choques	NMDA	Exposição contexto C	contexto A	Não- reativados (n=10)

Além da especificidade do contexto, este trabalho procurou avaliar se o intervalo de tempo entre a estimulação da MCPdl e a reativação é determinante para a potencialização das respostas de medo condicionado. Com este objetivo, no experimento 4, os animais foram submetidos ao CMCS com 3 choques no dia 1, microinjetados com NMDA ou PBS na MCPdl no dia 2, e reativados 48 horas depois (dia 4). A sessão de teste foi realizada no dia 5. A figura 10 representa esquematicamente o desenho experimental desta etapa do trabalho.

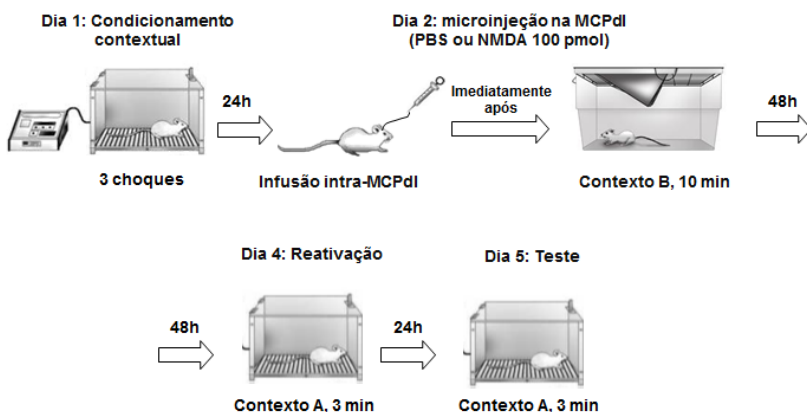


Figura 10. Protocolo do experimento 4 delineado para investigar se o efeito da estimulação da MCPdl sobre a evocação da memória é duradouro.

3.5.6. *Perfusão e histologia*

Após os testes comportamentais, os ratos que foram previamente submetidos a cirurgia estereotáxica foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 15% (2,3 mg/kg, via IP) e xilazina (10 mg/ml) e microinjetados com 0,2 µl de corante Azul de Evans para marcação do sítio de injeção. Em seguida, os animais foram perfundidos via intracardíaca com uma solução salina (0,9% NaCl), seguida por uma solução formaldeído (10%) durante 5 minutos cada. Os encéfalos foram então removidos e colocados em frascos contendo solução formaldeído 10%, onde ficaram imersos por 24 horas, e posteriormente transferidos para uma solução de sacarose 30% e mantidos em geladeira por no mínimo 24 horas antes de serem cortados. Cortes histológicos de 50 µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um criostato (CM1850; Leica, Alemanha) e dispostos em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Posteriormente, os cortes foram submetidos à coloração

de Giemsa permitindo a confirmação do sítio de injeção com o auxílio de um estereoscópio e do atlas do cérebro de ratos Paxinos e Watson (1998). A figura 11 representa a localização mais frequente dos sítios de injeção, entre -7,8 e -8,0mm posterior a partir do Bregma.

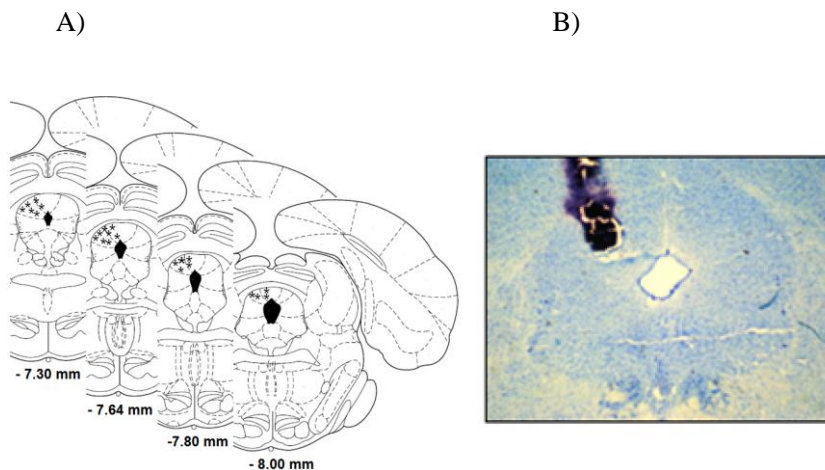


Figura 11. Sítios de injeção. (A) Representação esquemática. (Paxinos e Watson, 1998). (B) Fotomicrografia, marcação com corante Azul de Evans.

3.5.7. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas através do programa Statística[®] (versão 9.1; StatSoft[®], Tulsa, OK, USA). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparação dos dados e detecção de diferenças significativas. Os resultados foram expressos pela média + erro padrão da média (EPM) e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Quando apropriado, comparações *post-hoc* usando teste de Newman-Keuls foram utilizadas. Os gráficos foram desenhados no programa Prisma 5.0 (GraphPad Prism, San Diego, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1. Padronização do condicionamento de medo contextual subliminar.

A primeira etapa experimental teve como objetivo estabelecer um condicionamento de medo contextual capaz de promover como resposta comportamental baixos níveis de congelamento. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas mostrou que houve um efeito significativo do número de choques nas patas ($F(3,30) = 3,5737$; $p = 0,02540$), entre as sessões ($F(1, 30) = 37,612$; $p = 0,00000$), e na interação entre o número de choques e as sessões ($F(3,30) = 4,0116$; $p = 0,01632$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou um aumento do tempo de congelamento exibido pelos ratos que receberam 5 choques quando comparados com os grupos 0 e 1 choque, no dia da reativação. Não houve diferença entre os grupos na sessão de teste. Porém, o teste *post-hoc* revelou que os ratos que receberam 3 e 5 choques congelaram mais no dia da reativação do que no dia do teste.

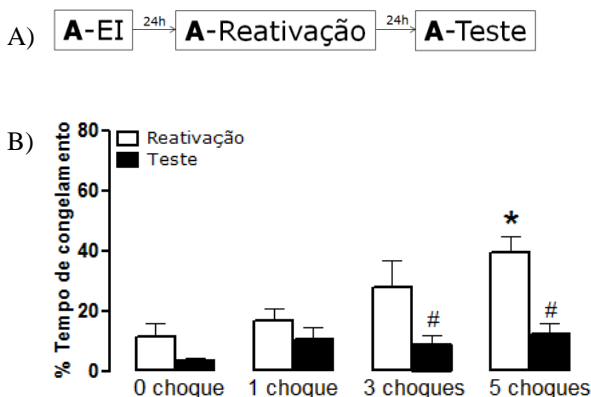


Figura 12. Padronização do condicionamento de medo contextual subliminar. (A) Desenho experimental (EI=estímulo incondicionado). (B) Porcentagem de tempo de congelamento exibido pelos animais submetidos ao CMCS na sessão de reativação (colunas brancas) e na sessão de teste (colunas pretas). As barras representam a média + E.P.M. De 8-9 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo 0 choque, na mesma sessão. # $p < 0,05$ em relação ao dia da reativação. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

4.2. Experimento 2. A estimulação química da MCPdl posterior ao condicionamento potencializa as respostas de medo contextual condicionadas.

No presente experimento, foi testada a hipótese de que o estado aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl com NMDA 100 pmol, no dia seguinte ao condicionamento, poderia potencializar as respostas de congelamento em reexposições subsequentes ao contexto. ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do número de choques ($F(2,40) = 9,9368$, $p = 0,0031$), do tratamento ($F(1,40) = 4,4543$, $p = 0,04111$) e entre as sessões ($F(2,80) = 9,5225$, $p = 0,00020$). A ANOVA também revelou um efeito significativo na interação entre o número de choques *vs* tratamento ($F(2,40) = 7,2662$, $p = 0,00203$), uma interação entre a diferença das sessões *vs* número de choques ($F(4,80) = 9,8704$, $p = 0,00000$) e interação entre a diferença das sessões *vs* número de choques *vs* tratamento ($F(4,80) = 5,9728$, $p = 0,00029$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou um aumento significativo ($p < 0,05$) na % tempo de congelamento durante a sessão de reativação no grupo que recebeu 3 choques ($n = 11$) e 24 h após a microinjeção de NMDA na MCPdl quando comparado ao grupo que recebeu 3 choques e infusão de PBS ($n = 6$). Além disso, o grupo 3 choques-NMDA também apresentou um aumento na % tempo de congelamento quando comparado aos grupos 0 choque-NMDA e 1 choque-NMDA (figura 13-B). O teste *post-hoc* revelou também que o grupo 3 choques-NMDA permaneceu em congelamento durante tempo significativamente maior que o grupo 3 choques-PBS durante a sessão de teste (figura 13-C). Quando os animais foram avaliados no contexto C (dia 10), não foi encontrada diferença significativa no comportamento de congelamento expresso pelos animais tratados com NMDA ou PBS, independente do número de choques (figura 13-D). Entretanto, o teste *post-hoc* revelou uma diminuição significativa do tempo de congelamento expresso no contexto C em relação ao congelamento observado no contexto A, tanto na sessão de reativação como na sessão de teste no contexto A. Adicionalmente, o teste *post-hoc* revelou uma diminuição significativa no congelamento do grupo 3 choques-NMDA do dia da reativação para o dia do teste.

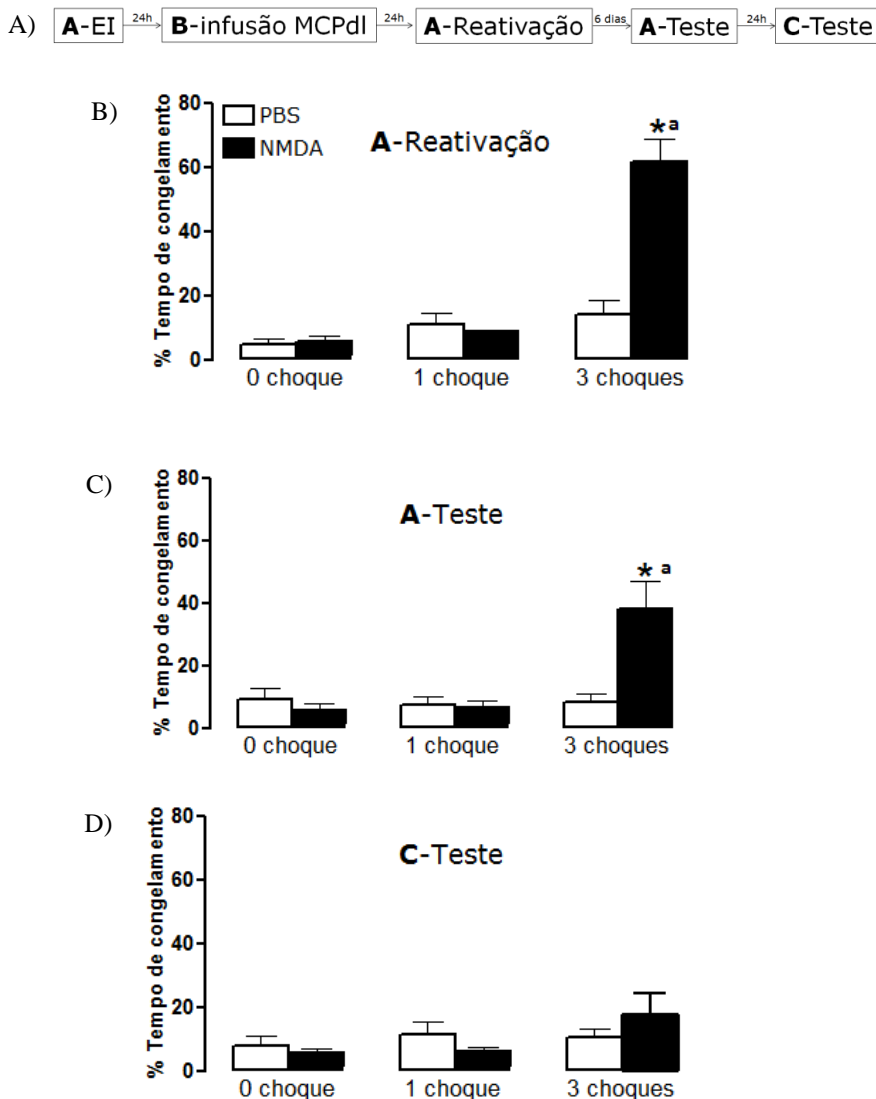


Figura 13. Efeito da estimulação química da MCPdl na evocação do traço de memória. (A) Protocolo do experimento 2. (B) Tempo de congelamento exibido pelos animais na sessão de reativação. As colunas brancas representam os animais microinjetados com PBS no dia 2, e as colunas pretas os animais microinjetados com NMDA. As barras representam a média + E.P.M. De 6-11 animais por grupo. (C) Tempo de congelamento exibido pelos animais no teste realizado no contexto A. (D) Tempo de congelamento exibido pelos animais no teste realizado no contexto C. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo PBS, na mesma sessão. a: $p < 0,05$ comparação do comportamento do mesmo sujeito no dia da reativação e no dia do teste. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

- 4.3. Experimento 3. A associação entre eventos aversivos distintos, não relacionados e dissociados no tempo, ocorre somente quando a reativação da memória acontece no mesmo contexto do condicionamento.

O experimento 3 teve como objetivo verificar se a associação entre o traço de memória do condicionamento de medo do dia 1 e o estado aversivo induzido pela estimulação da MCPdl no dia 2 ocorre quando o traço da memória é reativado através da apresentação do EC (contexto A) no dia 3. ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento ($F(1,31) = 15,864$, $p = 0,00038$), da reativação ($F(1,31) = 13,355$, $p = 0,00094$) e na interação entre o efeito do tratamento *vs* a reativação ($F(1,31) = 10,993$, $p = 0,00234$). Semelhante ao experimento 2, a ANOVA mostrou um efeito do tratamento no grupo de animais reativados e que receberam a infusão de NMDA intra-MCPdl (dia 2) no tempo de congelamento observado durante a sessão de reativação ($F(1,17) = 40,875$, $p = 0,00001$) e durante a sessão de teste ($F(1,17) = 26,380$, $p = 0,00008$), em relação ao comportamento observado nos animais que receberam infusão de PBS intra-MCPdl (dia 2). A mesma análise realizada no grupo de animais que não foram reativados (expostos ao contexto C no dia 3) mostrou que não houve efeito do tratamento no dia da reativação ($F(1,14) = 0,01540$, $p = 0,90300$) nem no dia do teste ($F(1, 14) = 0,24122$, $p = 0,63094$). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os ratos que receberam NMDA na MCPdl no dia 2 e tiveram o traço de memória reativado (reativados-NMDA) congelaram mais quando comparados aos ratos reativados-PBS e aos ratos não-reativados-NMDA na sessão de teste (figura 14-C), e na sessão de reativação (figura 14-B). Além disso, o teste *post-hoc* revelou uma diminuição significativa na % de tempo de congelamento expresso pelo grupo reativados-NMDA no dia do teste em relação ao dia da reativação.

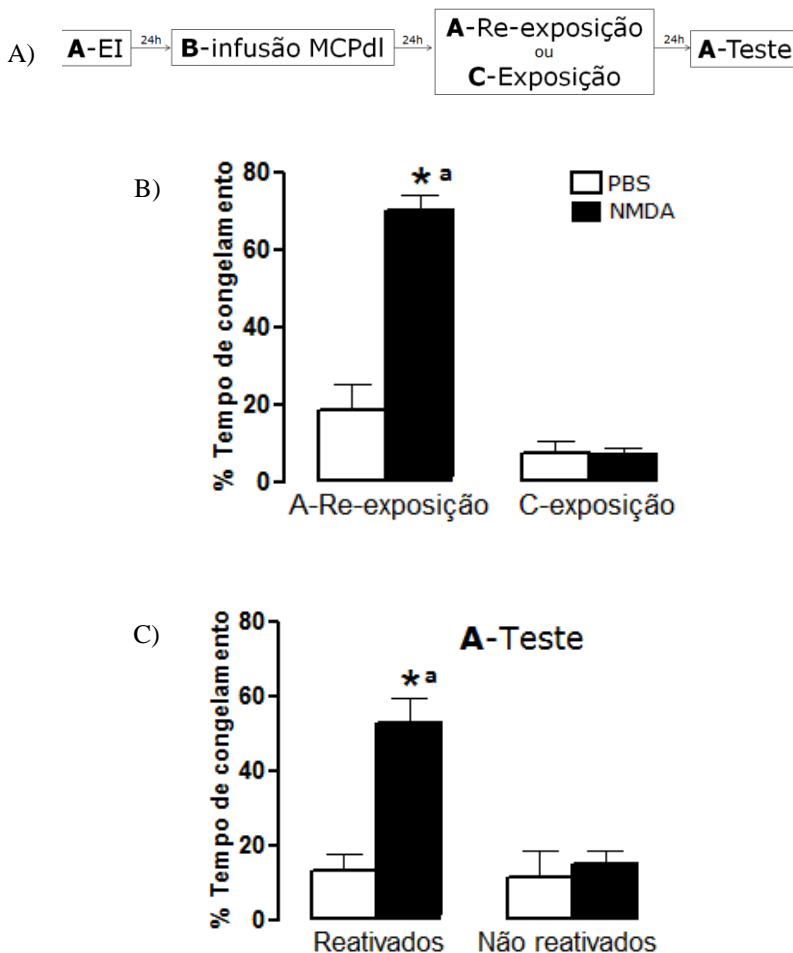
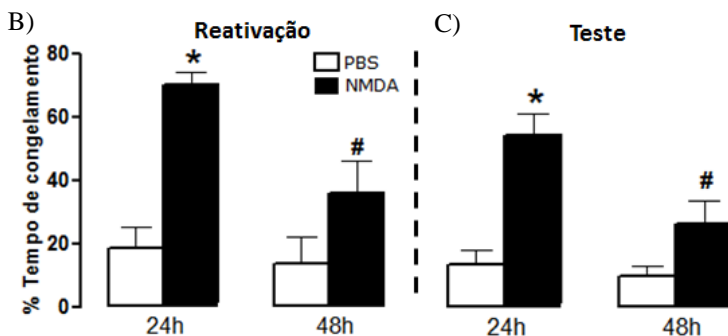
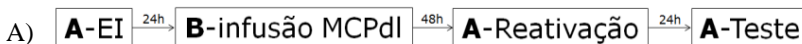


Figura 14. Importância do contexto associado na reativação da memória original para a potencialização do CD após a estimulação da MCPdl. (A) Protocolo do experimento 3. (B) Tempo de congelamento exibido pelos animais na reexposição ao contexto A ou na exposição ao contexto C (dia 3). As colunas brancas representam os animais microinjetados com PBS na MCPdl no dia 2 e as colunas pretas representam os animais microinjetados com NMDA. (C) Tempo de congelamento exibido pelos animais no dia do teste realizado no contexto A. As barras representam a média + E.P.M. De 6-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS e ao grupo NMDA-não reativado. a: $p < 0,05$ comparação do comportamento do mesmo sujeito no dia da reativação e no dia do teste. ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

4.4. Experimento 4. A potencialização das respostas defensivas desaparece quando a reativação ocorre 48 horas após a estimulação química da MCPdl.

O experimento 4 foi realizado com o objetivo de verificar se a potencialização do CD ainda é observada quando a reativação da memória original ocorre 48 horas após a estimulação da MCPdl. A ANOVA mostrou que não houve efeito significativo do tratamento ($F(2,13) = 1,2992$, $p = 0,30593$) quando os animais foram submetidos à reativação no contexto A, 48 horas após a infusão de droga ou veículo na MCPdl ($n = 6-10$). Para uma análise adicional, foi realizada uma comparação entre os animais deste experimento com os animais reativados do experimento 3, com o objetivo de verificar se houve diferença entre o tempo de congelamento exibido pelos animais que foram reativados 24 e 48 horas após a estimulação da MCPdl. A ANOVA para medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento ($F(2,30) = 13,676$, $p = 0,00006$) e da reativação ($F(2,30) = 3,9620$, $p = 0,02972$). Não houve efeito da interação tratamento vs reativação ($F(2,30) = 2,2603$, $p = 0,12180$). A análise *post-hoc* de Newman Keuls revelou uma diferença significativa entre os animais reativados 24 h após a estimulação da MCPdl com NMDA e os animais que foram reativados 48 h após a estimulação da MCPdl com NMDA.



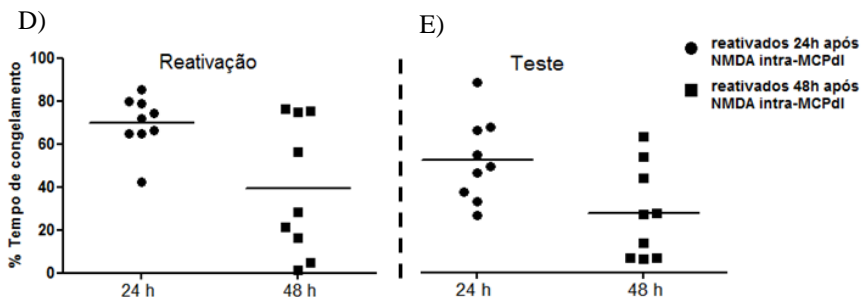


Figura 15. Efeito da potencialização do CD pela estimulação da MCPdl com NMDA quando a reativação ocorre 48 após a microinfusão da droga. (A) Protocolo do experimento 4. (B) Tempo de congelamento exibido pelos animais, na sessão de reativação, que ocorreu 24 horas ou 48 horas após a microinjeção de PBS (colunas brancas) ou NMDA (colunas pretas) na MCPdl. (C) Tempo de congelamento exibido pelos animais que foram reativados 24 horas ou 48 horas após a microinjeção de PBS (colunas brancas) ou NMDA (colunas pretas) na MCPdl na sessão de teste. As barras representam a média + E.P.M. De 6-10 animais por grupo. $*p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo PBS. $\# p < 0,05$ comparado ao grupo NMDA reativado 48 h após microinfusão da droga. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls. (D) Distribuição do tempo de congelamento exibido pelos animais microinjetados com NMDA no dia 2, observado no dia da reativação, quando esta aconteceu 24 h e 48 h após a estimulação da MCPdl. (E) Distribuição do tempo de congelamento exibido pelos animais microinjetados com NMDA no dia 2, observado na sessão de teste, quando a reativação aconteceu 24 h e 48 h após a estimulação da MCPdl.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que o estado aversivo induzido pela estimulação química da MCPdl potencializou as respostas de defesa no momento da evocação de um traço de memória aversiva contextual condicionada. Para que fosse possível observar um aumento do CD (tempo gasto em congelamento) em relação ao contexto condicionado, o presente trabalho inicialmente teve como objetivo padronizar o condicionamento de medo contextual subliminar (CMCS). Desta forma, os resultados do experimento 1 mostraram níveis de congelamento baixos que poderiam ser potencializados por um outro evento aversivo. O nível de congelamento expresso pelos animais ficou em torno de 30-40% (figura 12-B), enquanto que, de maneira geral, observa-se a expressão deste comportamento na faixa de 60-90%, que é considerado nível robusto de congelamento relacionado à aquisição da associação choque-contexto, evidenciado pela formação de uma memória duradoura (Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004; Bustos, Maldonado *et al.*, 2006; Lee, 2009). Segundo Fanselow (2005), o tempo gasto em congelamento observado em protocolos de condicionamento de medo contextual é proporcional à quantidade de choques aplicados nas patas no contexto a ser associado. Estudos em roedores indicam que os CD são condicionados a estímulos e situações associados com a ameaça; desta forma, a intensidade das respostas é modulada por características do estímulo ameaçador e da situação na qual o indivíduo se encontra (Blanchard e Blanchard, 2008). No experimento 1, foi observada uma diferença significativa na porcentagem de tempo de congelamento dos animais que receberam 5 choques em relação aos animais que receberam 0 ou 1 choque, indicando uma curva crescente de aprendizado emocional à medida em que o número de choques aumenta. Entretanto, um único treino com a aplicação de 3 ou 5 choques não é suficiente para formar uma memória duradoura, pois observou-se uma diminuição significativa do tempo de congelamento destes animais na reexposição ao contexto condicionado no dia do teste (figura 12-B). Este resultado indica uma redução do comportamento expresso no dia anterior, processo natural de diminuição progressiva do comportamento observado a partir da segunda exposição ao EC (Vervliet, 2008). O pequeno aumento na postura de congelamento do grupo de animais que recebeu 5 choques, em relação ao grupo 0 choques, observado na reativação e a facilidade na redução do congelamento observada no teste (figura 12-B) sugerem que a aplicação de 3 ou 5 choques de intensidade leve promovem a formação de um traço de memória, com baixa

relevância emocional e, portanto, sujeito à rápida redução na expressão do CD. Desta maneira, o experimento 1 mostrou que o protocolo utilizado foi eficaz em promover o CMCS, uma vez que houve aprendizado que resultou em respostas não duradouras, pouco robustas e passíveis de potencialização.

A etapa seguinte teve como objetivo investigar se uma experiência aversiva vivenciada entre o CMCS e a evocação do traço de memória poderia potencializar as respostas de medo observadas na reexposição ao contexto. Nossa hipótese baseou-se em um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, onde foi observado que as respostas a um odor condicionado poderiam ser potencializadas pela exposição ao odor de gato dezoito horas após o pareamento do odor com apenas um choque elétrico nas patas (Souza e Carobrez, 2009). Este modelo (condicionamento olfatório de medo em ratos) foi padronizado por Kroon e Carobrez (2009) e mostrou que para que o condicionamento olfatório aconteça, são necessários 5 choques elétricos de intensidade leve nas patas, aplicados na presença do odor neutro. A partir deste pareamento, o odor adquire propriedades aversivas e passa a evocar respostas defensivas. No trabalho de Souza e Carobrez, o pareamento com apenas 1 choque foi potencializado pela exposição ao odor do predador, 18 h após, evidenciado pela potencialização do CD em exposições subsequentes ao odor. Este resultado sugere que um evento aversivo, vivenciado após a consolidação de um traço de memória traumática, pode modificar a expressão comportamental na evocação da memória.

No presente trabalho, a estimulação química dos neurônios da MCPdl com NMDA 100 pmol foi utilizada como evento aversivo com base em dados bem estabelecidos na literatura que evidenciam o efeito da estimulação desta estrutura em promover sensações de medo intenso em humanos e animais (Nashold, Wilson *et al.*, 1969; Graeff, 1981; Brandao, De Aguiar *et al.*, 1982; Young, 1989; Brandao, Coimbra *et al.*, 1990; Graeff, 1990; Coimbra e Brandao, 1997; Brandao, Anseloni *et al.*, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999). A dose de 100 pmol de NMDA foi selecionada a partir de dados anteriores do nosso laboratório que demonstraram a indução de respostas defensivas (Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008), evidenciando que tal estimulação mimetiza respostas a uma situação potencialmente ameaçadora, que provavelmente resulta em um estado emocional negativo intenso. Além disso, recentemente em nosso laboratório foi demonstrado que a estimulação da MCPdl com NMDA

100 pmol pode ser utilizada como EI no pareamento com um odor neutro no modelo do condicionamento olfatório de medo em ratos (Kincheski e Carobrez, 2010). Os resultados do presente estudo mostraram uma potencialização da memória contextual condicionada (pareamento de 3 choques com o contexto), evidenciado pelo aumento no tempo de congelamento, do grupo tratado com NMDA 100 pmol (intra-MCPdl, dia 2), expresso na reativação e no teste, em relação ao grupo tratado com o veículo (figuras 13-B e 13-C), confirmando nossa hipótese. Embora os eventos (condicionamento de medo contextual e a estimulação da MCPdl) não estejam associados no tempo, como é classicamente observado em paradigmas de aprendizado associativo, eles parecem ser associados no momento da reativação, quando a apresentação do EC ocorre 24 h após a estimulação da MCPdl. Este efeito é duradouro uma vez que, na reexposição ao mesmo contexto seis dias após a reativação, ainda foi observada diferença significativa entre os animais tratados com NMDA e o grupo controle (figura 13-C). Este resultado sugere que o traço de memória que não tinha relevância emocional (evidenciado pela baixa expressão de congelamento dos animais tratados com PBS) tornou-se biologicamente relevante e foi fixado como uma memória duradoura. A redução do congelamento expresso pelo grupo 3 choques-NMDA no dia do teste em relação ao dia da reativação (intervalo de 6 dias), sugere estar em curso a extinção do comportamento normalmente observada após sucessivas reexposições ao contexto onde o animal foi condicionado. Por outro lado, não foi observada generalização do comportamento uma vez que o nível de congelamento expresso no contexto C, ambiente novo ao qual os animais foram expostos no dia 10, foi reduzido em relação às exposições anteriores ao contexto A (figura 13-D). Tal resultado evidencia que o comportamento observado no contexto A é específico para aquele contexto, não sendo generalizado para outros ambientes. Se os animais fossem reexpostos novamente ao contexto A no dia 10, não se descarta a hipótese de que o nível de congelamento seria semelhante ao observado no contexto C, resultante do processo de extinção do comportamento normalmente observado nos paradigmas de estudo da extinção do condicionamento contextual.

A elucidação dos mecanismos neurais envolvidos no efeito observado no experimento 2 requer experimentos adicionais de investigação molecular ou eletrofisiológica. Os mecanismos envolvidos no aprendizado associativo estão bem elucidados na literatura; sabe-se que a plasticidade associativa acontece na amígdala através das

conexões desta estrutura com outras do sistema límbico e do córtex sensorial (Ledoux, 2000). Porém, nos processos de aprendizado associativo os estímulos necessariamente estão associados no tempo, ou seja, o estímulo a ser condicionado deve estar presente no ambiente no momento da apresentação do estímulo aversivo. No presente estudo, foi observada a associação entre dois eventos aversivos distintos dissociados no tempo (CMCS e estimulação da MCPdl separados por 24 h de intervalo). Pesquisadores da área têm investigado os efeitos da sensibilização, a partir de experiências estressantes, na aquisição do medo condicionado (Fanselow e Poulos, 2005; Rau, Decola *et al.*, 2005; Rodríguez Manzanares, Isoardi *et al.*, 2005; Rau e Fanselow, 2009; Bustos, Giachero *et al.*, 2010). No presente trabalho, o condicionamento (CMCS) foi realizado antes da experiência estressante (estimulação da MCPdl), mostrando que a sensibilização promovida por um evento aversivo pode modificar não somente a aquisição, mas também a expressão da memória condicionada.

Neste sentido, algumas investigações acerca dos substratos neurais envolvidos no fenômeno da sensibilização foram realizadas utilizando-se o modelo de estresse um dia antes da aquisição do condicionamento de medo contextual (Rau, Decola *et al.*, 2005). Rodríguez-Manzanares e colaboradores (2005) investigaram se o aumento da excitabilidade neuronal na amígdala seria o mecanismo que dá suporte à sensibilização promovida pelo estresse prévio. A microinjeção de bicuculina (antagonista GABA_A, receptor que atua no controle inibitório da amígdala) na BLA mimetizou o efeito comportamental do estresse no aumento da aquisição do medo contextual condicionado; da mesma maneira, o pré-tratamento com midazolam (agonista do sítio modulatório do receptor GABA_A) preveniu tanto o efeito comportamental do estresse prévio quanto o efeito da microinjeção de bicuculina. Dados de eletrofisiologia somaram-se a estes resultados, e Rodríguez-Manzanares *et al.* (2005) concluíram que o estresse prévio facilitou a indução de LTP na amígdala, resultando em plasticidade sináptica aumentada e na facilitação da aquisição do medo condicionado, sugerindo que a hiperexcitabilidade desta estrutura pode ser uma das bases da sensibilização do medo

É possível que o estado emocional negativo promovido pela estimulação química da MCPdl seja intenso de tal forma, que tenha duração prolongada e seja capaz de sensibilizar o organismo para responder a estímulos seguintes. A sensibilização é um fenômeno que

usualmente é temporário e sua duração depende da intensidade do estímulo (Eichenbaum, 2008). Os resultados do presente trabalho mostraram que quando a evocação aconteceu 24 h após a estimulação da MCPdl com NMDA, foi observada a potencialização do CD. Entretanto, a diferença entre o tempo de congelamento exibido pelos animais tratados com NMDA e PBS desapareceu quando a evocação foi realizada 48 h após a estimulação, sugerindo que o efeito sensibilizante da atividade da MCPdl diminui com o tempo (figuras 15-B e 15-C). Como pode ser observado nas figuras 15-D e 15-E, que representam a distribuição do tempo de congelamento exibido por cada rato estimulado com NMDA na MCPdl, nas sessões de reativação e teste no contexto A, respectivamente, a distribuição do comportamento dos animais que foram reativados 48 horas após a estimulação é heterogênea, ou seja, parte dos animais exibiram congelamento aumentado e outra parte não exibiu aumento no CD observado. Para a elucidação dos mecanismos neuroquímicos responsáveis pela sensibilização promovida pela estimulação da MCPdl, serão necessários estudos adicionais.

Sabe-se que além do seu papel na coordenação e execução do CD, a MCPdl é uma estrutura importante na sinalização de perigo e sua atividade é importante também na aquisição do aprendizado aversivo. Graeff (1994) propôs um “sistema cerebral de defesa” constituído de estruturas interconectadas com a função de integrar e elaborar as estratégias comportamentais de defesa adequadas à situação ameaçadora, entre as quais estão incluídas a MCP e a amígdala, além da zona medial do hipotálamo e do sistema septo-hipocampal. Além disso, outros trabalhos que buscaram elucidar a circuitaria neural responsável pelo aprendizado aversivo sugerem que a MCPd está indiretamente conectada com a amígdala enviando projeções para estruturas superiores como o tálamo e hipotálamo (Kinchski e Carobrez, 2010). Da mesma forma, um trabalho elegante desenvolvido por Ledoux, Blair e colaboradores, avaliou respostas neuronais a um EI em ratos a partir de registros eletrofisiológicos na amígdala e na MCP e concluiu que a MCP estaria criticamente envolvida na transmissão da informação aversiva para os neurônios da amígdala (Johansen, Tarpley *et al.*, 2010). Neste sentido, a MCP seria responsável pela instrução da plasticidade associativa na amígdala uma vez que quando esta estrutura é inativada com muscimol, a aquisição de um condicionamento de medo foi prejudicada (Johansen, Tarpley *et al.*, 2010). Com base nestes dados, é possível sugerir que a sensibilização observada a partir da estimulação química da MCPdl no presente trabalho seria resultante de um sinal

aversivo que, ao ser transmitido para a amígdala, poderia fortalecer sinapses associativas e diminuir o limiar de responsividade destes neurônios, resultando na hiperexcitabilidade neuronal induzida pelo estresse observada na BLA por Rodríguez-Manzanares (2005).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a estimulação da MCPdl sensibilizou a evocação do traço de memória resultando na expressão robusta do comportamento de congelamento. O experimento 3 foi delineado com o objetivo de verificar a dependência do contexto na reativação para que o efeito da sensibilização fosse observado, ou se tal sensibilização promoveria a generalização do comportamento para outros estímulos (por exemplo um novo contexto). Os resultados mostraram que o efeito é dependente da reativação no contexto associado, já que, no dia do teste, não foi observada diferença significativa no congelamento exibido pelos animais tratados com NMDA ou PBS que não foram reativados (expostos a um novo contexto) conforme figura 14-B e 14-C. Este resultado exclui a possibilidade de generalização do comportamento a partir da sensibilização promovida pela estimulação da MCPdl já que no dia 3 os ratos tratados com NMDA não exibiram níveis elevados de congelamento no contexto C (figura 8-B). Concordando com os dados do experimento 2, os animais tratados com NMDA exibiram mais tempo de congelamento na reativação no contexto A (figura 14-B) e no dia do teste (figura 14-C) em relação aos ratos tratados com veículo. Muito importante no modelo estudado, é o fato de que existe a necessidade da recordação do evento traumático para que tal memória não seja extinta. Os resultados do experimento 4 mostraram ainda que esta recordação deve acontecer no dia seguinte à estimulação da MCPdl, pois quando a evocação ocorreu dois dias após a estimulação, o efeito sensibilizante não foi mais evidenciado pela potencialização do CD (figuras 15-B e 15-C), já que neste grupo de animais não foi observada diferença entre o tempo de congelamento exibido pelos animais microinjetados com PBS ou NMDA no dia 2.

Conforme descrito no início desta dissertação, o congelamento é um dos comportamentos executados sob a coordenação da MCPdl. Portanto, da observação da postura de congelamento durante a etapa de reativação conclui-se que a evocação promove a ativação dos neurônios da MCPdl. Considerando a possibilidade de que a ativação da MCPdl transmite um sinal aversivo para instruir plasticidade associativa na amígdala, é possível que a atividade da MCPdl no momento da evocação seja um

fator que contribui para a confirmação da relevância aversiva do contexto A, promovendo a reconsolidação do traço de memória original.

Outra possibilidade a ser considerada é a de que a estimulação da MCPdl com NMDA 100 pmol pode promover um sinal que reverbera durante algum tempo e por isso mantém a estrutura sensibilizada para eventos que ocorram num futuro próximo. Hebb em 1949 (Eichenbaum, 2008) propôs uma teoria para explicar o fenômeno da consolidação de memórias. Em sua teoria, sugeriu que um traço de memória inicialmente transitório modifica estruturalmente os neurônios ativados pelo aprendizado para que a informação possa permanecer armazenada por um tempo. A ativação de um desses neurônios promoveria um sinal reverberatório entre os demais neurônios em sinapses associativas, que repetidamente transmite o sinal entre os neurônios “associados”. A figura 16 representa esquematicamente a concepção de Hebb sobre o circuito reverberatório.

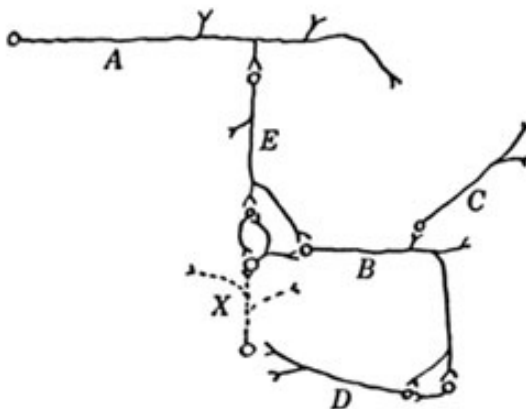


Figura 16. Representação esquemática do circuito reverberatório de Hebb. A informação que entra na rede de neurônios (neurônio A) circula entre os neurônios B, C, D e E repetidas vezes. Adaptado de Eichenbaum, 2008.

Neste sentido, em nosso trabalho, é possível que a estimulação da MCPdl com NMDA promova um sinal aversivo que reverbera dentro da própria estrutura, mantendo-a sensibilizada para estímulos futuros. Um dia após esta estimulação, a MCPdl está sensibilizada e um estado

emocional negativo está presente quando o animal for colocado no contexto condicionado. Neste momento, a evocação abre a chamada janela de reconsolidação, e o estado emocional negativo pode confirmar a valência aversiva do contexto condicionado. Os resultados mostraram que quando os animais foram estimulados na MCPdl e no dia seguinte foram expostos ao EC, o tempo de congelamento foi significativamente maior do que aqueles animais que não foram estimulados, sugerindo que a MCPdl pode estar sensibilizada no momento da evocação e portanto a resposta observada é a execução do comportamento de congelamento mais robusto que os animais que não foram estimulados nesta estrutura. O sinal reverberatório deve ter duração limitada, já que o efeito de potencialização do CD tende a desaparecer quando a reativação acontece 48 h após a estimulação da MCPdl (figuras 10-B e 10-C).

Segundo Dudai (2002), a recordação de um evento pode reativar ou reconstruir a representação interna de um estímulo na ausência deste. A sensibilização do medo promove uma alteração na emocionalidade presente no momento da recordação que provavelmente modifica a relevância emocional do contexto associado. Considerando que a evocação pode dar início ao processo de reconsolidação, que tem como propósito adaptativo atualizar as memórias para manter sua relevância (Lee, 2009), a sensibilização do medo poderia ser um fator desencadeante de respostas inapropriadas. A maioria dos trabalhos utiliza a fase de reconsolidação com o propósito de prejudicar as memórias de medo, modificando seu caráter emocional no sentido de diminuir a expressão do medo. O presente trabalho mostrou que a reconsolidação é uma fase que permite atualizar a memória no sentido de agregar relevância emocional e aumentar a expressão do medo, se o estado emocional negativo estiver presente no momento da reativação do traço de memória original. Este pode ser um dos mecanismos envolvidos na neurobiologia de transtornos de ansiedade: a atualização de uma memória traumática a partir de um estado interno emocionalmente relevante. A estimulação da MCPdl foi capaz de sensibilizar o medo, alterando o estado emocional do rato quando foi reexposto ao contexto condicionado uma dia após a ativação da MCPdl com NMDA 100 pmol. Desta forma, o medo sensibilizado expresso no dia da reativação promoveu a modificação do caráter emocional da memória, resultando em CD mais robusto em evocações subsequentes.

Este mecanismo de sensibilização pode ser responsável por permear os diversos transtornos de ansiedade. Conforme mencionado na

introdução desta dissertação, os maus tratos na infância estão relacionados com maior severidade dos sintomas em pacientes com ansiedade social (Simon, Herlands *et al.*, 2009) e com outros transtornos de ansiedade (Sanchez, Ladd *et al.*, 2001; Van Harmelen, Van Tol *et al.*, 2010), evidenciando sensibilização do medo decorrente do estresse no início da vida. O histórico emocional negativo do indivíduo parece interferir no processamento de experiências aversivas, podendo aumentar a relevância de um evento traumático e modificar o padrão de processamento da memória resultando na execução de respostas defensivas inapropriadas. Além disso, há evidências de que a interação genética-ambiente seja responsável pelo desenvolvimento dos transtornos de ansiedade. Caspi e colaboradores (2003) investigaram, do ponto de vista genético, porque as experiências estressantes levam ao desenvolvimento de depressão em algumas pessoas e em outras não. Eles constataram que um polimorfismo funcional na região promotora do gene para o transportador de serotonina pode modular a influência de experiências emocionais negativas no desenvolvimento da depressão. Estes achados corroboram as observações no circuito simples do molusco *Alpysia*, descrito na introdução deste trabalho, de que a serotonina seria o neurotransmissor responsável pela modulação do aumento da responsividade de neurônios reflexos no fenômeno da sensibilização. Tais resultados dão suporte à ideia de que a serotonina estaria criticamente envolvida na sensibilização do medo. Considerando que a atividade dos neurônios da MCPdl é modulada por este neurotransmissor (Moraes, Bertoglio *et al.*, 2008), estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos neuroquímicos envolvidos no fenômeno observado no nosso trabalho.

Adicionalmente, não se descarta a hipótese de que a microinjeção de NMDA na MCPdl possa promover uma LTP nesta estrutura, além de induzir LTP em outras regiões cerebrais conectadas à MCP, direta ou indiretamente. Desta forma, experimentos futuros serão necessários para elucidar os mecanismos moleculares recrutados após a estimulação da MCPdl e no momento da reativação do traço de memória.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram:

- 1) Que o estado emocional negativo induzido pela estimulação química da MCPdl potencializou o traço de memória de medo quando a reativação deste traço ocorreu 24h após tal estimulação;
- 2) Que esta potencialização é dependente do contexto associado uma vez que o aumento das respostas de medo não foi observado quando os animais estimulados com NMDA foram colocados em um contexto não associado em uma sessão subsequente a estimulação da MCPdl;
- 3) Que a potencialização ocorre quando a reativação do traço de memória acontece um dia após a estimulação da MCPdl, porém quando a reativação é feita 48 h após a estimulação desta estrutura, o efeito tende a desaparecer uma vez que parte dos animais apresenta CD potencializado e outra parte comporta-se como os animais controle.
- 4) Não foram observados sinais de generalização uma vez que os animais tratados com NMDA e reativados no contexto associado não congelaram quando colocados em um novo contexto.
- 5) Que o aumento da resposta de medo observado foi duradouro já que os animais tratados com NMDA exibiram resposta de medo robusta seis dias após a reativação.

Com base no exposto acima, concluímos que o estado emocional aversivo, promovido pela estimulação química da MCPdl, sensibilizou a recordação de um evento traumático, potencializando as respostas defensivas frente a um contexto anteriormente pareado com um EI, em um paradigma de CMCS. A nossa hipótese foi confirmada uma vez que a estimulação química da MCPdl foi capaz de promover a modificação da resposta comportamental na reativação de um traço de memória condicionada.

Em adição, o modelo animal estudado neste trabalho acrescenta uma nova perspectiva para o estudo dos transtornos de ansiedade. Conforme descrito anteriormente, modelos de sensibilização do medo são utilizados em analogia a doenças como o TEPT. O presente estudo propõe que um indivíduo normal, sem histórico de ansiedade patológica

ou de experiências aversivas no início da vida, pode desenvolver uma psicopatologia decorrente da sensibilização da recordação de um evento traumático, caso este indivíduo tenha uma experiência emocionalmente negativa após o trauma e antes da lembrança deste trauma através de uma pista associada.

7. REFERÊNCIAS

- Aggleton, J. P. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. Trends Neurosci, v.16, n.8, Aug, p.328-33. 1993.
- Alberini, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? Trends Neurosci, v.28, n.1, Jan, p.51-6. 2005.
- Association, A. P. Diagnostic and statistical manual of mental disorders-DSM-III. Washington, DC: APA Press. 3th 1980.
- _____. Diagnostic and statistical manual of mental disorders- DSM-IV. Washington, DC: APA Press. 4th 1994.
- Bailey, D. J., J. J. Kim, *et al.* Acquisition of fear conditioning in rats requires the synthesis of mRNA in the amygdala. Behav Neurosci, v.113, n.2, Apr, p.276-82. 1999.
- Baratti, C. M., M. M. Boccia, *et al.* Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. Braz J Med Biol Res, v.42, n.2, Feb, p.148-54. 2009.
- Beitz, A. J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. Neuroscience, v.7, n.1, Jan, p.133-59. 1982.
- Bignante, E. A., G. Paglini, *et al.* Previous stress exposure enhances both anxiety-like behaviour and p35 levels in the basolateral amygdala complex: modulation by midazolam. Eur Neuropsychopharmacol, v.20, n.6, Jun, p.388-97. 2010.
- Bittencourt, A. S., A. P. Carobrez, *et al.* Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-METHYL--aspartic acid glutamate receptors. Neuroscience, v.125, n.1, p.71-89. 2004.

- Blanchard, D. C. e R. J. Blanchard. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. J Comp Physiol Psychol, v.81, n.2, Nov, p.281-90. 1972.
- Blanchard, R. J. e D. C. Blanchard. Crouching as an index of fear. J Comp Physiol Psychol, v.67, n.3, Mar, p.370-5. 1969.
- _____. Defensive Behaviors, Fear, and Anxiety. In: J. P. Huston (Ed.). Handbook of Anxiety and Fear. Dusseldorf: Academic Press, v.17, 2008. Defensive Behaviors, Fear, and Anxiety, p.3-7
- Blanchard, R. J., K. J. Flannelly, *et al.* Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. J Comp Psychol, v.100, n.2, Jun, p.101-7. 1986.
- Boccia, M. M., M. G. Blake, *et al.* Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice: effects of a new different learning task. Neuroscience, v.135, n.1, p.19-29. 2005.
- Borszcz, G. S. Contribution of the ventromedial hypothalamus to generation of the affective dimension of pain. Pain, v.123, n.1-2, Jul, p.155-68. 2006.
- Brandao, M. L., V. Z. Anseloni, *et al.* Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. Neurosci Biobehav Rev, v.23, n.6, p.863-75. 1999.
- Brandao, M. L., N. C. Coimbra, *et al.* Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. Neurosci Biobehav Rev, v.14, n.4, Winter, p.495-9. 1990.
- Brandao, M. L., J. C. De Aguiar, *et al.* GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. Pharmacol Biochem Behav, v.16, n.3, Mar, p.397-402. 1982.
- Brandao, M. L., J. M. Zanoveli, *et al.* Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. Behav Brain Res, v.188, n.1, Mar 17, p.1-13. 2008.

- Brunzell, D. H. e J. J. Kim. Fear conditioning to tone, but not to context, is attenuated by lesions of the insular cortex and posterior extension of the intralaminar complex in rats. Behav Neurosci, v.115, n.2, Apr, p.365-75. 2001.
- Bustos, S. G., M. Giachero, *et al.* Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. Neuropsychopharmacology, v.35, n.5, Apr, p.1097-108. 2010.
- Bustos, S. G., H. Maldonado, *et al.* Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. Neuroscience, v.139, n.3, p.831-42. 2006.
- _____. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. Neuropsychopharmacology, v.34, n.2, Jan, p.446-57. 2009.
- Canteras, N. S., J. A. Kroon, *et al.* Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. Neurosci Biobehav Rev, v.32, n.7, Sep, p.1228-35. 2008.
- Canteras, N. S. e M. Goto. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. Neuroreport, v.10, n.2, Feb 5, p.413-8. 1999.
- Carew, T. J., H. M. Pinsker, *et al.* Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in aplysia. Science, v.175, n.4020, Jan 28, p.451-4. 1972.
- Carobrez, A.P., Teixeira, K.V., *et al.* Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B 45 receptor. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.697-709. 2001.
- Carobrez, A.P., Schenberg, L.C., *et al.* Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. PhysiolBehav, v.4, Oct 31, p.439-44. 1983.

- Caspi, A., K. Sugden, *et al.* Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science, v.301, n.5631, Jul 18, p.386-9. 2003.
- Cavalli, J., L. J. Bertoglio, *et al.* Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. Neurobiol Learn Mem, v.92, n.4, Nov, p.512-8. 2009.
- Coimbra, N. C. e M. L. Brandao. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. Behav Brain Res, v.87, n.1, Aug, p.97-103. 1997.
- Darwin, C. R. The expression of emotions in man and animals. London. 1872
- Davis, M. Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. Behav Neurosci, v.103, n.3, Jun, p.495-503. 1989.
- Di Scala, G., M. J. Mana, *et al.* Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. Physiol Behav, v.40, n.1, p.55-63. 1987.
- Di Scala, G. S., G. Conditioned place aversion produced by microinjections of semicarbazide into the periaqueductal gray of the rat. Brain Research, v.483, n.1, p.91-97. 1989.
- Dielenberg, R. A. e I. S. McGregor. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.597-609. 2001.
- Dudai, Y. Memory from A to Z. Keywords, Concepts, Beyond. Oxford: Oxford University Press. 2002
- . Reconsolidation: the advantage of being refocused. Curr Opin Neurobiol, v.16, n.2, Apr, p.174-8. 2006.
- Eichenbaum, Howard. Learning & Memory. New York, USA: WW Norton & Company, 2008.

- Fanselow, M. S. e J. J. Kim. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. Behav Neurosci, v.108, n.1, Feb, p.210-2. 1994.
- Fanselow, M. S. e J. E. Ledoux. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. Neuron, v.23, n.2, Jun, p.229-32. 1999.
- Fanselow, M. S. e A. M. Poulos. The neuroscience of mammalian associative learning. Annu Rev Psychol, v.56, p.207-34. 2005.
- Fendt, M. Expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle after stimulation and blockade of AMPA/Kainate and GABAA receptors in the dorsal periaqueductal gray. Brain Research, v.880, n.1-2, p.1-10. 2000.
- Floyd, N. S., J. L. Price, *et al.* Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. J Comp Neurol, v.422, n.4, Jul 10, p.556-78. 2000.
- Forcato, C., V. L. Burgos, *et al.* Reconsolidation of declarative memory in humans. Learn Mem, v.14, n.4, Apr, p.295-303. 2007.
- Godsil, B. P., M. A. Blackmore, *et al.* Modulation of an activity response with associative and nonassociative fear in the rat: a lighting differential influences the form of defensive behavior evoked after fear conditioning. Learn Behav, v.33, n.4, Nov, p.454-63. 2005.
- Graeff, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. Braz J Med Biol Res, v.14, n.4-5, Oct, p.239-65. 1981.
- _____. Brain defense systems and anxiety. In: B. G. Roth M, Noyes R (Ed.). Handbook of anxiety. Amsterdam: Elsevier, v.3, 1990. Brain defense systems and anxiety., p.307–354

- _____. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Braz J Med Biol Res, v.27, n.4, Apr, p.811-29. 1994.
- _____. Medicamentos Ansiolíticos. In: F. S. G. Frederico Guilherme Graeff (Ed.). Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: Atheneu, v.1, 1999. Medicamentos Ansiolíticos
- Gray, J. A., Mcnaughton, N. The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System, Second Edition. OXford: OXford University Press. 2000
- Grillon, C. Startle reactivity and anxiety disorders: aversive conditioning, context, and neurobiology. Biol Psychiatry, v.52, n.10, Nov 15, p.958-75. 2002.
- Groves, P. M. e R. F. Thompson. Habituation: a dual-process theory. Psychol Rev, v.77, n.5, Sep, p.419-50. 1970.
- Helmstetter, F. J. Contribution of the amygdala to learning and performance of conditional fear. Physiol Behav, v.51, n.6, Jun, p.1271-6. 1992.
- Hupbach, A., R. Gomez, *et al*. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. Learn Mem, v.14, n.1-2, Jan-Feb, p.47-53. 2007.
- Johansen, J. P., J. W. Tarpley, *et al*. Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. Nat Neurosci, v.13, n.8, Aug, p.979-86. 2010.
- Jovanovic, T., N. Q. Blanding, *et al*. Childhood abuse is associated with increased startle reactivity in adulthood. Depress Anxiety, v.26, n.11, p.1018-26. 2009.
- Kandel, K., Iversen. Learning and Memory. Cap. 62. In: (Ed.). Principles of Neural Science, Learning and Memory. 4a. edição. 2000.
- Kincheski, G.C., S.R. Mota-Ortiz, M.H. Sukikara, N.S. Canteras, A.P. Carobrez. Thalamic targets mediate the olfactory fear

- conditioning following chemical stimulation of dorsolateral periaqueductal gray matter. Society for Neuroscience. San Diego, California. 706.24. 2010.
- Kim, J. J. e M. S. Fanselow. Modality-specific retrograde amnesia of fear. Science, v.256, n.5057, May 1, p.675-7. 1992.
- Kroon, J. A. e A. P. Carobrez. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. Neurobiol Learn Mem, v.91, n.1, Jan, p.32-40. 2009.
- Lanuza, E., K. Nader, *et al.* Unconditioned stimulus pathways to the amygdala: effects of posterior thalamic and cortical lesions on fear conditioning. Neuroscience, v.125, n.2, p.305-15. 2004.
- Ledoux, J. E. Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci, v.23, p.155-84. 2000.
- Lee, J. L. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. Nat Neurosci, v.11, n.11, Nov, p.1264-6. 2008.
- _____. Reconsolidation: maintaining memory relevance. Trends Neurosci, v.32, n.8, Aug, p.413-20. 2009.
- _____. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. Front Behav Neurosci, v.4, p.168. 2010.
- Luyten, L., D. Vansteenwegen, *et al.* Optimization of a contextual conditioning protocol for rats using combined measurements of startle amplitude and freezing: the effects of shock intensity and different types of conditioning. J Neurosci Methods, v.194, n.2, Jan 15, p.305-11. 2010.
- Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Annu Rev Neurosci, v.24, p.897-931. 2001.
- Mcgaugh, J. L. Memory--a century of consolidation. Science, v.287, n.5451, Jan 14, p.248-51. 2000.

- Mcguire, J., J. P. Herman, *et al.* Enhanced fear recall and emotional arousal in rats recovering from chronic variable stress. Physiol Behav, v.101, n.4, Nov 2, p.474-82. 2010.
- Mcnaughton, N. e P. J. Corr. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. Neurosci Biobehav Rev, v.28, n.3, May, p.285-305. 2004.
- Miserendino, M. J., C. B. Sananes, *et al.* Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. Nature, v.345, n.6277, Jun 21, p.716-8. 1990.
- Moraes, C. L., L. J. Bertoglio, *et al.* Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. Behav Brain Res, v.194, n.2, Dec 12, p.181-6. 2008.
- Nader, K. Memory traces unbound. Trends Neurosci, v.26, n.2, Feb, p.65-72. 2003.
- Nader, K. e O. Hardt. A single standard for memory: the case for reconsolidation. Nat Rev Neurosci, v.10, n.3, Mar, p.224-34. 2009.
- Nader, K., G. E. Schafe, *et al.* Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature, v.406, n.6797, Aug 17, p.722-6. 2000.
- Nashold, B. S., Jr., W. P. Wilson, *et al.* Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. J Neurosurg, v.30, n.1, Jan, p.14-24. 1969.
- Pavesi, E., N. S. Canteras, *et al.* Acquisition of Pavlovian Fear Conditioning Using beta-Adrenoceptor Activation of the Dorsal Premammillary Nucleus as an Unconditioned Stimulus to Mimic Live Predator-Threat Exposure. Neuropsychopharmacology, Jan 5. 2011.
- Parrott-Sheffer, C., Tikkanen, A. Animal Learning. In: Encyclopedia Britannica online. 2007. Disponível em:

<<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1349539/animal-learning/61996/Types-of-learning?anchor=ref320590>> acesso em 08/11/2011

- Paxinos, G., Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press. 1998
- Pedreira, M. E., B. Dimant, *et al.* Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. Pharmacol Biochem Behav, v.52, n.2, Oct, p.385-95. 1995.
- Petrovich, G. D. e L. W. Swanson. Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit. Brain Res, v.763, n.2, Jul 25, p.247-54. 1997.
- Rang, H. P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. Pharmacology. 2007
- Rau, V., J. P. Decola, *et al.* Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. Neurosci Biobehav Rev, v.29, n.8, p.1207-23. 2005.
- Rau, V. e M. S. Fanselow. Exposure to a stressor produces a long lasting enhancement of fear learning in rats. Stress, v.12, n.2, p.125-33. 2009.
- Richardson, R. Shock sensitization of startle: learned or unlearned fear? Behav Brain Res, v.110, n.1-2, Jun 1, p.109-17. 2000.
- Rodrigues, S. M., J. E. Ledoux, *et al.* The influence of stress hormones on fear circuitry. Annu Rev Neurosci, v.32, p.289-313. 2009.
- Rodriguez Manzanares, P. A., N. A. Isoardi, *et al.* Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. J Neurosci, v.25, n.38, Sep 21, p.8725-34. 2005.
- Rogan, M. T. e J. E. Ledoux. LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. Neuron, v.15, n.1, Jul, p.127-36. 1995.

- Rogan, M. T., U. V. Staubli, *et al.* Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. Nature, v.390, n.6660, Dec 11, p.604-7. 1997.
- Rose, J. K. e C. H. Rankin. Blocking memory reconsolidation reverses memory-associated changes in glutamate receptor expression. J Neurosci, v.26, n.45, Nov 8, p.11582-7. 2006.
- Sah, P., R. F. Westbrook, *et al.* Fear conditioning and long-term potentiation in the amygdala: what really is the connection? Ann N Y Acad Sci, v.1129, p.88-95. 2008.
- Sanchez, M. M., C. O. Ladd, *et al.* Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. Dev Psychopathol, v.13, n.3, Summer, p.419-49. 2001.
- Sara, S. J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. Learn Mem, v.7, n.2, Mar-Apr, p.73-84. 2000.
- Schenberg, L. C. e F. G. Graeff. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. Pharmacol Biochem Behav, v.9, n.3, Sep, p.287-95. 1978.
- Shi, C. e M. Davis. Pain pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: lesion studies. J Neurosci, v.19, n.1, Jan 1, p.420-30. 1999.
- Simon, N. M., N. N. Herlands, *et al.* Childhood maltreatment linked to greater symptom severity and poorer quality of life and function in social anxiety disorder. Depress Anxiety, v.26, n.11, p.1027-32. 2009.
- Souza, R.R., A.P. Carobrez. Potentiated olfactory fear conditioning by predator orodor exposure or dexamethasone treatment in rats. Society for Neuroscience. 2009. Chicago.F.02.f.
- Sukikara, M. H., S. R. Mota-Ortiz, *et al.* A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. J Neurosci, v.26, n.9, Mar 1, p.2583-9. 2006.

- Suzuki, A., S. A. Josselyn, *et al.* Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. J Neurosci, v.24, n.20, May 19, p.4787-95. 2004.
- Tang, J., S. Ko, *et al.* Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. Mol Pain, v.1, p.6. 2005.
- Teixeira, K. V. e A. P. Carobrez. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. Behav Neurosci, v.113, n.1, Feb, p.196-203. 1999.
- Van Harmelen, A. L., M. J. Van Tol, *et al.* Reduced medial prefrontal cortex volume in adults reporting childhood emotional maltreatment. Biol Psychiatry, v.68, n.9, Nov 1, p.832-8. 2010.
- Vervliet, B. Learning and memory in conditioned fear extinction: effects of D-cycloserine. Acta Psychol (Amst), v.127, n.3, Mar, p.601-13. 2008.
- Young, R. F. Brain and spinal stimulation: how and to whom! Clin Neurosurg, v.35, p.429-47. 1989.